

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Ciência e Tecnologia de Materiais
Departamento de Tecnologia de Polímeros

“Estudo da Imobilização de Lipase em Copolímero de
Divinilbenzeno-Estireno e Aplicação na Síntese do Butirato
de Butila”

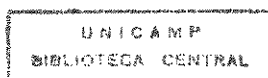
Autor: Pedro C. Oliveira

Orientadora
Prof^a Dr^a Lúcia H. I. Mei

Co-orientadora
Prof^a Dr^a Heizir F. de Castro

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

Fevereiro - 1999



| | |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | BC |
| N.º CHAMADA: | UNICAMP |
| | OL4e |
| V. | Ex. |
| TOMBO BC/ | 37685 |
| PROC. | 229/99 |
| C | <input type="checkbox"/> |
| D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO R.B. | 11,00 |
| DATA | 07/05/99 |
| N.º CPD | |

CM-00123026-1


FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

OL4e Oliveira, Pedro Carlos de
Estudo da imobilização de lipase em copolímero de divinilbenzeno-estireno e aplicação na síntese do butirato de butila. / Pedro Carlos de Oliveira.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

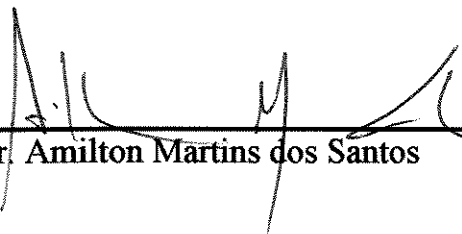
Orientadoras: Lúcia H. I. Mei, Heizir F. de Castro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipase. 2. Candida. 3. Copolímeros grafitizados.
4. Síntese orgânica. I. Mei, Lúcia H. I.. II. Castro, Heizir F. de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 10 de fevereiro de 1999 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



Prof.ª Dr.ª Lúcia Helena Innocentini Mei
Orientadora



Prof. Dr. Amilton Martins dos Santos



Prof. Dr. Henrique Celso Trevisan

Esta versão corresponde a redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pelo Eng. Pedro Carlos de Oliveira e aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de fevereiro de 1999.



Profª Drª Lúcia Helena Innocentini Mei
Orientadora

Agradecimentos:

À minha mãe Yolanda pelo incentivo na retomada dos estudos.

À Prof^ª Dr.^a Heizir F. de Castro pela orientação científica na realização desse trabalho.

À Prof^ª Dr.^a Lúcia H.I. Mei pela liberdade concedida na escolha do tema desenvolvido e pelo incentivo na execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Henrique C. Trevisan pelas sugestões e correções.

À amiga Gizeida pela síntese do copolímero utilizado nesse trabalho.

À amiga Cleide Mara pelas discussões durante a execução dos experimentos.

Ao amigo Armando Miatto pelas correções de ortografia e gramática.

À Faculdade de Engenharia Química de Lorena pelo afastamento concedido para execução do trabalho de tese.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À memória de meu pai,
Prof. Quinzinho

RESUMO

Este trabalho teve como finalidade principal obter um derivado ativo e estável da lipase de *Candida rugosa* através de sua imobilização em um suporte de natureza polimérica. Foram testadas duas potenciais matrizes, o polimetilolacrilamida (PNMA) e o copolímero de divinilbenzeno-estireno (STYDVB), em função de suas características satisfatórias em termos de resistência ao impacto e à tração, aliadas ao seu alto grau de dureza e termoestabilidade. A enzima lipase foi imobilizada por adsorção nessas resinas, usando tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) ou heptano como meio dispersante, sendo selecionado para estudos posteriores, o derivado de lipase imobilizada em STYDVB obtido em presença de heptano.

Tanto a lipase livre como a lipase imobilizada em STYDVB foram caracterizadas através da determinação do perfil de atividade em função do pH e temperatura, estabilidade térmica e, para o caso da lipase imobilizada, determinou-se a estabilidade operacional, em bateladas consecutivas, e à estocagem. Os resultados experimentais demonstraram que a lipase livre apresentou um pH ótimo de 8,0 e a imobilizada apresentou um pH ótimo de 7,5, ambas na temperatura de 37°C. A lipase imobilizada foi desativada somente em temperaturas superiores a 50°C, restando praticamente 100% de sua atividade inicial na faixa de temperatura entre 37-50°C, por cerca de 60 minutos.

A atividade catalítica da lipase imobilizada em STYDVB foi também avaliada na síntese do butirato de butila, sendo estudada a influência de duas variáveis do processo: razão molar entre butanol e ácido butírico e concentração da enzima, na variável resposta (conversão do butanol). Sob condições adequadas conseguiu-se atingir um rendimento de 90% na reação do éster acima mencionado. O estudo da estabilidade operacional demonstrou que o imobilizado perdeu relativamente pouco de sua atividade de esterificação depois de 12 bateladas consecutivas de 24 horas cada uma. Tal resultado mostrou um bom desempenho do imobilizado em meio não aquoso.

ABSTRACT

The objective of this work was to prepare an active and stable derivative of a microbial lipase (*Candida rugosa*), through its immobilization onto polymeric resins. Two potential matrixes were tested, polymethylolacrilamide (PNMA) and styrene-divinylbenzene copolymer (STYDVB), using different dispersion media (aqueous medium - buffer solution 0,1M of sodium phosphate pH 7,0 and organic medium - heptane). The immobilized *Candida rugosa* was more active when the coupling procedure was performed by physical adsorption on styrene-divinylbenzene copolymer in the presence of heptane.

Both free and immobilized lipase on STYDVB were characterized by determining: activity profile as a function of pH, temperature and thermal stability. For the immobilized lipase, operational and storing stabilities were also determined. Experiments results demonstrated that free lipase showed a pH optimum of 8.0 at temperature of 37°C, while the immobilized enzyme in the same temperature had 7.5 as the optimum pH. The immobilized lipase showed thermal inactivation only at temperature above 50°C, having retained practically 100% of its initial activity for temperature from 37-50°C, for 60 minutes.

The catalytic activity of the lipase immobilized on STYDVB was also verified in the synthesis of butylbutyrate by studying the influence of two variables: molar ratio between butanol and butyric acid and enzyme concentration on the butanol conversion rate. Under suitable reaction conditions, esterification yields as high as 90% were attained. Batch operational stability tests indicated that a small enzyme deactivation occurred after 12 consecutive batches of 24 hours of duration each. Such results revealed good potential for recycling under non-aqueous medium.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS | i |
| LISTA DE TABELAS | ii |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 03 |
| 2.1- Biotransformação | 03 |
| 2.2- Enzimas como Catalisadores | 05 |
| 2.3- Lipases | 09 |
| 2.3.1- Propriedades e Características | 09 |
| 2.3.2- Reações Catalisadas pela Lipase | 11 |
| 2.4- Biotransformações com Lipases em Meio Orgânico | 13 |
| 2.4.1- Seleção de Solventes. | 16 |
| 2.4.2- Influência da Água nas Biotransformações Catalisadas por Lipases | 19 |
| 2.5- Imobilização de Enzimas | 21 |
| 2.5.1- Principais Métodos de Imobilização | 24 |
| 2.5.1.1- Aprisionamento | 24 |
| 2.5.1.2- Adsorção | 24 |
| 2.5.1.3- Ligação Iônica | 26 |
| 2.5.1.4 - Quelação | 26 |
| 2.5.1.5- Ligação Covalente | 27 |
| 2.5.1.6- Reticulação ou Ligação Covalente Cruzada | 27 |
| 2.5.2- Imobilização da Lipase | 28 |
| 2.5.3- Suportes para Imobilização de Lipase | 30 |

| | |
|---|--------|
| 2.5.4- Suportes Poliméricos | 34 |
| 2.5.4.1- Resina n-metilolacrilamida | 37 |
| 2.5.4.2-Copolímeros à Base de STYDVB | 38 |
| 2.6- Sínteses de Bioésteres Catalisadas por Lipases | 43 |
| 3-. MATERIAIS E MÉTODOS | 46 |
| 3.1- Materiais | 46 |
| 3.2- Equipamentos | 47 |
| 3.3- Procedimento Experimental | 47 |
| 3.3.1- Seleção do Suporte de Imobilização | 47 |
| 3.3.2- Imobilização da Lipase em STY-DVB | 48 |
| 3.3.3- Procedimento Geral das Reações de Esterificação | 48 |
| 3.4- Análises | 50 |
| 3.4.1- Determinação de Proteína | 50 |
| 3.4.2- Determinação da Atividade Lipolítica | 50 |
| 3.4.3- Teor de Ácido Graxo | 51 |
| 3.4.4- Teor de Água | 51 |
| 3.4.5- Teor de Álcool e Éster | 51 |
| 3.4.6- Coeficientes de Partição | 52 |
| 3.5- Avaliação do Procedimento de Imobilização | 52 |
| 3.5.1- Massa Seca | 52 |
| 3.5.2- Recuperação de Proteína (RP %) | 53 |
| 3.5.3- Rendimento de Imobilização (RI%) | 53 |
| 3.6- Propriedades Catalíticas da Lipase Livre e Imobilizada | 54 |
| 3.6.1- Influência do pH | 54 |
| 3.6.2- Influência da Temperatura | 54 |
| 3.6.3- Estabilidade Térmica | 54 |
| 3.6.4- Influência do Tempo de Estocagem | 54 |

| | |
|--|----|
| 3.7- Desempenho da Lipase Imobilizada em STYDVB | 55 |
| 3.7.1- Influência da Razão Molar | 55 |
| 3.7.2- Influência da Massa de Lipase Imobilizada | 55 |
| 3.7.3- Estabilidade Operacional | 56 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 4.1- Seleção do Suporte | 57 |
| 4.2- Imobilização da Lipase no Suporte Selecionado | 59 |
| 4.3- Mecanismo Provável de Retenção de Lipase em STYDVB | 62 |
| 4.4- Propriedades Catalíticas da Lipase Livre e Imobilizada | 63 |
| 4.5- Aplicação do Sistema Imobilizado na Síntese do Butirato de Butila | 71 |
| 4.5.1- Influência da Razão Molar | 71 |
| 4.5.2- Influência da Massa de Lipase Imobilizada | 74 |
| 4.5.3- Comparação do Desempenho da Lipase Livre e Imobilizada | 75 |
| 4.5.4- Estabilidade Operacional | 78 |
| 5. CONCLUSÕES | 81 |
| 6. SUGESTÕES | 82 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| APÊNDICES: Tabelas com os Resultados Experimentais | |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 2.1- Mecanismo chave-fechadura | 08 |
| FIGURA 2.2- Mecanismo do encaixe induzido | 08 |
| FIGURA 2.3- Classificação dos métodos para imobilização de enzimas | 23 |
| FIGURA 2.4- Representação esquemática da enzima adsorvida em suporte sólido e usada em solvente orgânico | 32 |
| FIGURA 2.5- Estrutura porosa de uma pérola de polímero | 36 |
| FIGURA 2.6- Estrutura da resina de n-Metilolacrilamida | 38 |
| FIGURA 2.7- Mecanismo de formação de copolímeros de estireno e divinilbenzeno | 43 |
| FIGURA 3.1- Metodologia para imobilização de lipase em STYDVB | 49 |
| FIGURA 4.1- Influência do suporte na taxa de esterificação alcançada pela lipase imobilizada em PNMA e STYDVB | 59 |
| FIGURA 4.2- Comparação da estabilidade operacional da lipase imobilizada em STYDVB | 62 |
| FIGURA 4.3- Provável mecanismo de adsorção da lipase em STY-DVB | 64 |
| FIGURA 4.4- Estudo da influência do pH nas atividades das lipases livre e imobilizada | 64 |
| FIGURA 4.5- Estudo da influência da temperatura nas atividades das lipases livre e imobilizada | 66 |
| FIGURA 4.6- Comparação da estabilidade térmica das lipases livre e imobilizada | 66 |
| FIGURA 4.7- Estudo da estabilidade térmica da lipase imobilizada | 67 |
| FIGURA 4.8- Estabilidade do derivado imobilizado em função do tempo de estocagem | 67 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 4.9a- Esferas do copolímero de divinilbenzeno-estireno com aumento de 50 vezes. | 69 |
| FIGURA 4.9b- Esferas do copolímero de divinilbenzeno-estireno com lipase depositada, aumento de 50 vezes. | 69 |
| FIGURA 4.9c- Esferas do copolímero de divinilbenzeno-estireno com lipase depositada, aumento de 50 vezes. | 70 |
| FIGURA 4.9d- Esferas do copolímero de divinilbenzeno-estireno com lipase depositada, aumento de 50 vezes. | 70 |
| FIGURA 4.10- Influência da razão molar dos reagentes na conversão molar do Butanol | 73 |
| FIGURA 4.11- Estudo da influência da massa de lipase imobilizada na conversão molar do Butanol | 75 |
| FIGURA 4.12 Comparação do desempenho da lipase livre, lipozyme e lipase-STYDVB na síntese do Butirato de Butila | 77 |
| FIGURA 4.13- Estabilidade operacional da lipase imobilizada em STYDVB quando aplicada em bateladas consecutivas | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 2.1- Vantagens da catálise enzimática em meio orgânico | 14 |
| TABELA 2.2- Exemplos de métodos para imobilização de lipases | 29 |
| TABELA 2.3- Exemplos de suportes e procedimentos de imobilização de lipases | 32 |
| TABELA 2.4- Propriedades e uso do Butirato de Butila | 45 |
| TABELA 4.1- Eficiência de Imobilização da lipase em PNMA e em STYDVB | 58 |
| TABELA 4.2- Imobilização da lipase em STYDVB em diferentes meios de dispersão | 61 |
| TABELA 4.3- Balanço de massa da lipase imobilizada em STYDVB | 61 |
| TABELA 4.4- Caracterização da lipase imobilizada em STYDVB | 68 |
| TABELA 4.5- Valores dos coeficientes de partição | 74 |
| TABELA 4.6- Diferenças básicas entre duas preparações de lipase imobilizada (Lipozyme e lipase-STYDVB) | 77 |
| TABELA 4.7- Comparação da estabilidade operacional do sistema STYDVB-lipase com dados encontrados na literatura | 79 |

1. INTRODUÇÃO

A produção de ésteres por meio de reações enzimáticas ou biotransformações tem estimulado a otimização de processos realizados em meio não aquoso para produzir insumos para as indústrias de alimentos, fármacos, emulsificantes e essências (YAN WU *et al.*, 1996).

Nas biotransformações, as lipases se destacam por sua versatilidade em reações de hidrólise, esterificação e interesterificação, com extrema simplicidade de processo, qualidade superior do produto final e excelente rendimento (CASTRO e ANDERSON, 1995). Por esta razão, essas enzimas têm atraído a atenção de químicos orgânicos sintéticos, principalmente por suas propriedades catalíticas e disponibilidade comercial (JESUS *et al.*, 1997).

Em meio orgânico as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador e do aceptor as reações catalisadas por lipases incluem, entre outras, a formação de ésteres de ácidos graxos (CASEY e MACRAE, 1992), utilizados como aromatizantes na indústria de alimentos (POSORKE *et al.*, 1988 e MANJON *et al.*, 1991).

Recentemente inúmeros trabalhos têm sido realizados para estabelecer metodologias de imobilização de lipases pancreática e microbiana em diferentes tipos de suportes, tendo em vista as vantagens oferecidas por esses derivados, das quais destacam-se: a possibilidade de reutilização da enzima, aumento da estabilidade da enzima em função das interações físicas e químicas entre o suporte e a molécula da enzima e a facilidade de separação do produto (RESLOW *et al.*, 1988; TANAKA e SONOMOTO, 1990; BALCÃO *et al.*, 1996).

Estudos comparativos levam a concluir que influências marcantes são observadas entre lipases quando imobilizadas em diferentes suportes (NORIN *et al.*,

1988). A característica que mais interfere na escolha de um tipo de suporte para imobilização da lipase é sua afinidade ou não pela água, ou seja, caráter hidrofílico ou hidrofóbico (RESLOW *et al.*, 1988).

Resultados encontrados na literatura sugerem que os melhores suportes para a imobilização de lipases são os que garantem maior interação com a enzima, isto é, os suportes hidrofóbicos (BJÖRKLING *et al.*, 1991; RUA e BALLESTEROS, 1994). Portanto, a imobilização de lipases em suportes adequados constitui uma área de interesse em constante desenvolvimento. O suporte é considerado ideal se fixar a enzima de maneira irreversível enquanto utilizado, não afetar sua atividade e não interferir na reação onde esteja sendo aplicado.

Entre os suportes hidrofóbicos e de natureza polimérica podemos destacar as resinas trocadoras de íons como a ENTP (polipropilenoglicol) – resina hidrofóbica foto reticulante – (FUKUNAGA *et al.*, 1996) e copolímeros de estireno-divinilbenzeno (RUCKENSTEIN e WANG, 1993) os quais apresentaram graus satisfatórios de atividade enzimática em síntese orgânica.

Neste trabalho, a enzima lipase, de comprovada afinidade por superfícies (BOSLEY e PEILOW, 1997), foi imobilizada por adsorção em suportes de natureza polimérica, sendo selecionada a matriz de copolímero de estireno com concentrações moderadas de divinilbenzeno. O sistema imobilizado foi caracterizado e aplicado na síntese do butirato de butila. O resultado obtido nesta síntese foi comparado com aquele alcançado por uma particular preparação comercial de lipase imobilizada (Lipozyme), empregando o mesmo sistema reacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Biotransformação

O termo biotransformação é aplicado a uma modificação específica ou a uma interconversão de estruturas químicas realizadas por biocatalisadores, diferindo assim da fermentação, na qual o substrato é convertido ao produto final por meio de uma complexa via metabólica (VÉZINA, 1987).

A escolha do tipo de biocatalisador é efetuada entre microorganismos vivos íntegros ou outros materiais biológicos como RNA¹⁷, anticorpos ou enzimas isoladas ou contidas em células (PEREIRA, 1995). O uso de enzimas isoladas é preferível quando existirem limitações com relação à permeabilidade do substrato através da membrana da célula ou quando ocorrerem reações paralelas indesejáveis (LEUENBERGER, 1990).

Enzimas isoladas ou purificadas possuem um número de propriedades que tornam seu uso atrativo como catalisador em biotransformação. Elas são extremamente ativas, versáteis e realizam uma variedade de transformações sob condições brandas e de maneira seletiva. Adicionalmente, desenvolvimentos recentes em enzimologia, principalmente engenharia de proteínas e reações enzimáticas em meio não aquoso, aumentaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisador em processos industriais.

Um grande número de trabalhos nesta área pode ser encontrado na literatura especializada, tendo em vista o interesse científico demonstrado por diversos grupos de pesquisa, no sentido de elucidar as propriedades e o comportamento de biocatalisadores em meio não aquoso. Consequentemente, o número de rotas de síntese que incorporam um passo enzimático torna-se cada vez mais crescente. Bem ilustrativos são os trabalhos de revisão de literatura publicados por SOLEWICK (1987); MONOT (1994) e FABER (1997), que reúnem exemplos importantes, sob o

ponto de vista de síntese orgânica, de reações catalisadas por diferentes classes de enzimas.

Embora, atualmente, a biotransformação não possa competir com a rota química já otimizada para a produção de compostos industrialmente importantes, poderia, gradativamente, substituí-la, devido à grande demanda de compostos naturais biodegradáveis que não causam danos ao meio ambiente. Por exemplo, a produção da maioria dos compostos orgânicos geralmente requer condições drásticas de temperatura e pressão, gerando impurezas como produtos de degradação, inviabilizando seu uso em alimentos sem redistilação prévia, tornando o processo, desta forma, energética e economicamente dispendioso. Portanto, a conservação de energia e a redução da degradação térmica tornam a biotransformação um processo mais atraente que os processos químicos tradicionais (PIMENTEL, 1996).

Os processos enzimáticos vêm sendo estudados em todo o mundo como rotas alternativas para a produção de inúmeros insumos químicos. Com a consolidação dos processos químicos e petroquímicos convencionais, as indústrias procuram desenvolver novos produtos e aprimorar processos estabelecidos.

Essa tecnologia se constitui numa das variantes que pode ser empregada com sucesso em processos industriais, principalmente quando, por razões de mercado, reduções no custo de produção é de fundamental necessidade.

Apesar dos sistemas de enzima imobilizada exigirem um investimento inicial em matéria-prima (enzima e suporte), eles conduzem a reatores mais compactos (menor custo de investimento), os quais operam com menores tempos de residência (menores custos operacionais).

A aplicabilidade prática e o potencial das enzimas vêm se firmando em larga escala na síntese de produtos intermediários de interesse químico e farmacêutico. As enzimas já competem com outros catalisadores - inclusive metais de transição - na obtenção de sintons quirais, largamente utilizados pela indústria de fármacos como intermediários na preparação - com alto rendimento e grande pureza - de substâncias

complexas, cuja atividade biológica depende da estereoquímica correta da molécula.

É inquestionável a afirmação de Whitesides: “O químico sintético que for capaz de utilizar esta classe de catalisadores (enzimas), estará mais apto para resolver a nova geração de problemas em síntese situados na fronteira entre a química e a biologia. Aqueles que relutarem no seu uso ou de outras técnicas sintéticas com base biológica, poderão ficar à margem de alguns dos mais excitantes problemas da ciência molecular” (WHITESIDES e WONG, 1985).

As biotransformações tratadas neste trabalho empregaram enzimas isoladas como catalisadores.

2.2- Enzimas como Catalisadores

Enzimas são catalisadores biológicos, constituídos de proteínas ou glicoproteínas, que participam de muitas reações químicas nos organismos vivos. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas catalisam as reações em condições brandas como temperatura e pressão ambientes, apresentando um grande poder catalítico, acelerando as reações e multiplicando suas velocidades por fatores de 10^8 a 10^{11} (CHEETHAM, 1995). De fato, a maioria das reações em sistemas biológicos não ocorrem com velocidades perceptíveis quando na ausência dessa classe de catalisador (STRYER, 1992).

As enzimas são altamente específicas tanto com relação à natureza das reações onde podem ser aplicadas com êxito como com relação aos reagentes empregados na síntese, os quais são chamados de substratos. Uma enzima geralmente catalisa um só tipo de reação química ou um conjunto de reações intimamente relacionadas. Reações paralelas que levam à formação de produtos secundários raramente ocorrem em reações catalisadas por enzimas, em contraste com as não-catalisadas. O grau de especificidade para o substrato é geralmente alto e, às vezes, virtualmente absoluto (STRYER, 1992).

Esses biocatalisadores são usados há muito tempo, mesmo antes de serem devidamente caracterizados, e seu uso estendeu-se gradualmente à indústria de bebidas, de alimentos, de produtos têxteis e na medicina. O desenvolvimento da bioquímica, a elucidação dos mecanismos de reação e o desenvolvimento de novas fontes de enzimas, diversificaram as suas aplicações (TREVISAN, 1990).

As enzimas, como todas as proteínas naturais, são constituídas de uma ou mais cadeias de L-amino-ácidos ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas. A composição em amino-ácidos e a sequência destes na cadeia são características particulares de cada enzima e, de certa forma, induzem a uma conformação tridimensional própria, essencial à atividade catalítica. Esta atividade é exercida pelo sítio ativo, que é definido como a (s) parte (s) da estrutura da enzima que atua (m) em contato direto com a substância a ser transformada, isto é, o substrato. O alto grau de especificidade das enzimas sugeriu a Fischer em 1894 (FABER, 1997) a analogia da chave com a fechadura, para tentar explicar a interação enzima-substrato (FIGURA 2.1). Essa relação assume que a enzima tem uma região, o sítio ativo, que é complementar em tamanho, forma e natureza química ao substrato. Atualmente sabe-se que essa região é um arranjo espacial específico dos grupos R-residuais de aminoácidos, que podem interagir com o substrato.

Na maioria das vezes, dois ou três aminoácidos participam do processo catalítico, e para tanto faz-se necessário que estes estejam arranjados de modo a formarem uma cavidade tridimensional específica na molécula de enzima.

O grande número de aminoácidos presentes na molécula e que não participam da reação, desempenham o importante papel de formar e manter a enzima na estrutura terciária apropriada, por meio de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, entre outras, e justificam a alta massa molecular das enzimas (CONN e STUMPF, 1972).

A relação chave fechadura não explica contudo porque um substrato parecido com outro quimicamente não reage da mesma forma, embora possua os grupos que

participam da reação catalítica e portanto se ajusta à enzima. Para explicar esse fato, Koshland em 1968 (FABER, 1997) propôs a teoria do ajuste induzido (FIGURA 2.2). Sua hipótese estabelece que embora substratos semelhantes possuam os grupos reagentes, outros grupos presentes em um determinado substrato devem induzir a enzima a uma mudança conformacional que resulta num alinhamento não apropriado dos grupos reativos da enzima. Partindo dessa hipótese pode-se justificar a especificidade da enzima relativa a certos substratos, uma vez que esses devem induzir a enzima a uma conformação espacial de tal forma a alinhar apropriadamente os grupos reativos.

Grande parte do poder catalítico das enzimas ocorre por elas aproximarem os doadores do grupo acil aos complexos enzima-substrato (ES), prendendo-os ao sítio ativo, caracterizando nesse estágio a sua especificidade e atividade.

O sítio ativo de uma enzima contém os radicais de aminoácidos, conhecidos como grupamentos catalíticos, que são os responsáveis diretos pela formação e pela ruptura de ligações. Em função da conformação tridimensional da molécula, os sítios ficam espacialmente próximos, definindo uma estrutura peculiar que confere às enzimas propriedades distintas e específicas. Apesar das enzimas diferirem em estrutura, especificidade e modo de catálise, algumas generalizações acerca de seus centros ativos podem ser feitas, tais como (STRYER, 1992):

- o sítio ativo ocupa uma parte relativamente pequena do volume total de uma enzima;
- o sítio ativo é uma entidade tridimensional;
- os substratos ligam-se às enzimas por múltiplas atrações fracas;
- os sítios ativos são depressões ou fendas;
- a especificidade de ligação depende do arranjo definido com precisão pelos átomos no centro ativo.

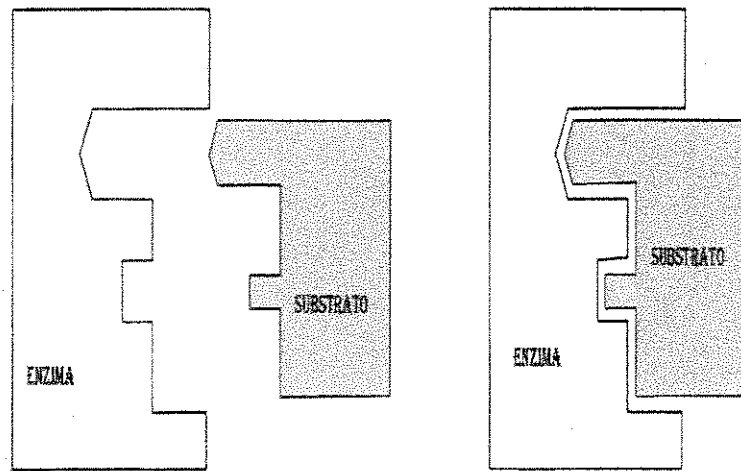


FIGURA 2.1- Mecanismo chave fechadura

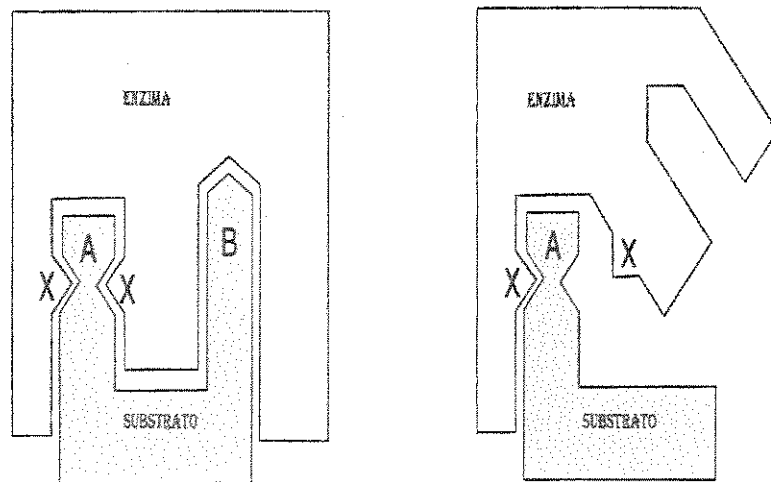


FIGURA 2.2- Mecanismo do encaixe induzido

Portanto, a característica mais importante de uma enzima é o seu poder catalítico, e não a sua estrutura. Deste modo, o nome de uma enzima não especifica a estrutura mas, contrariamente, define a principal reação catalisada. Assim sendo, cerca de 2000 enzimas estão catalogadas e cada uma delas atua em um certo tipo de substrato e catalisa uma reação específica, o que permite que sejam classificadas em seis grandes grupos de acordo com a «International Union of Biochemistry»: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

A frequência no uso de um particular tipo de enzima não está uniformemente distribuída entre suas diferentes classes. Esta distribuição segue um perfil definido por suas vantagens técnicas e versatilidade de aplicação. Segundo FABER (1997), a participação das hidrolases (lipases, esterases e proteases) nas reações de biotransformação perfaz um total de 65%. Este fato é uma consequência direta da disponibilidade comercial dessas enzimas, o que permite a seleção da enzima mais adequada para a biotransformação desejada.

Entre os processos químicos de maior interesse industrial e que podem ser catalisados por lipases estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos (RUCKENSTEIN e WANG, 1993; CASTRO *et al.*, 1996, HAYES, 1996), interesterificação de óleos e gorduras (WISDOM *et al.*, 1987), preparação de ésteres óticamente ativos (KOSHIRO *et al.*, 1993) e síntese de álcoois de terpenos (NISHIO *et al.*, 1987).

2.3- Lipases

2.3.1- Propriedades e Características

As lipases (EC.3.1.1.3) são hidrolases de ésteres de glicerol que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para a produção de ácidos graxos, acilgliceróis e glicerol. Como seus substratos naturais são geralmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa

e insolúveis em soluções aquosas, essas enzimas são definidas como esterases que atuam especificamente em ésteres insolúveis e na interface água-óleo (GILBERT, 1993).

A atividade catalítica das lipases é sensivelmente reduzida na ausência de uma interface, o que é evidenciado pela baixa conversão na hidrólise de ésteres solúveis em água.

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Inicialmente, elas eram obtidas de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (FROST e MOSS, 1987). Atualmente são produzidas, preferencialmente, por microorganismos, devido às facilidades de controle e ao aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução no custo de obtenção. Em geral, os microorganismos mais utilizados para a produção de lipases são os fungos do gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor* e as leveduras do gênero *Candida* (BALCÃO *et al.*, 1996).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter peso molecular entre 20.000 e 200.000 e serem ativas na faixa de pH de 4,0 a 9,0. São usualmente estáveis em soluções aquosas neutras a temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (MACRAE e HAMMOND, 1985). A especificidade é uma das características mais importantes da lipase. Aproximadamente quatro classes de especificidade podem ser definidas. A primeira refere-se à classe de lipídeos. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo tri-, di- ou monoglicídeos, éster de colesterol, metiléster etc. A segunda é a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, no qual a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia ou

em relação à presença de dupla ligação na cadeia do resíduo de ácido graxo. Finalmente merece referência a estereoespecificidade, ou seja, algumas lipases são capazes de discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica. Esta propriedade tem sido usada com bastante sucesso na separação seletiva de compostos contendo misturas racêmicas, tarefa de difícil execução por métodos químicos convencionais. Lipase tem sido empregada para resolução de racematos, resultando em rendimentos elevados, para obtenção de ésteres, álcoois e ácidos óticamente puros (KOSHIRO *et al.*, 1993). Este tipo de reação pode ter uma importância fundamental, pois como é de conhecimento, isômeros de alguns compostos apresentam diferentes propriedades. No caso específico dos medicamentos, o enantiômero indesejável pode ter até uma ação completamente diferente do composto opticamente ativo ou pode mesmo causar efeitos colaterais. No campo alimentício sabe-se que a forma R do aspartame tem um sabor adocicado enquanto a forma S tem um sabor amargo (WELSH *et al.*, 1989).

Atualmente, lipases microbianas são produzidas em grande quantidade por diversas indústrias, tais como: Novo Nordisk, Sigma, Amano, entre outras. Este fato pode justificar o crescente emprego de lipase na obtenção de produtos de grande interesse industrial para diversos setores.

2.3.2- Reações Catalisadas pela Lipase

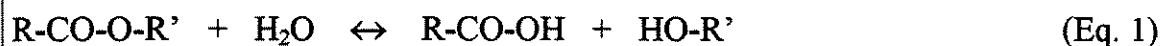
A função natural das lipases é catalisar a hidrólise de glicerídeos e outros ésteres graxos. Contudo, esta reação é facilmente reversível. Consequentemente, as lipases são excelentes catalisadores, para um largo espectro de reações de esterificação e interesterificação. Dessa forma, as lipases podem catalisar a formação de glicerídeos a partir de ácidos graxos e glicerol.

Além disso, as lipases podem também catalisar um espectro de substratos totalmente diferentes em meio orgânico, como as interesterificações.

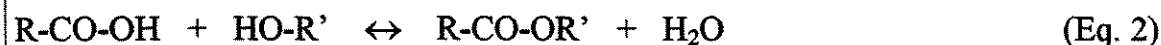
No ESQUEMA 2.1 são mostradas as principais reações mediadas pela lipase,

bem como a participação da água no equilíbrio dessas reações. Segundo JOHN e ABRAHAM (1991) o teor de água é considerado um fator crítico do processo, podendo interferir diretamente nas velocidades e nos rendimentos das reações, na extensão de reações paralelas de hidrólise, na atividade da enzima e na seletividade da reação.

1- Hidrólise de éster: Na hidrólise a água é um dos reagentes e deve ser adicionada para catalisar a reação no sentido desejado.

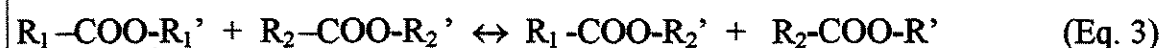


2- Síntese de éster: Na síntese, a água é formada durante o processo na mesma proporção do produto principal e, portanto, geralmente interfere no equilíbrio reacional quando não são adotadas estratégias de controle e/ou remoção da quantidade extra de água.

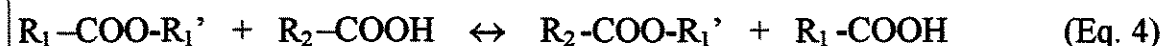


3- Interesterificações: Na interesterificação a água não participa do equilíbrio reacional, entretanto, deve ser fornecida em Quantidades mínimas necessárias para manter ativa e estável a preparação enzimática.

3.1- Transesterificação



3.2- Acidólise



3.3- Alcoólise



ESQUEMA 2.1- Reações catalisadas pelas lipases

2.4- Biotransformações com Lipases em Meio Orgânico

O estudo de enzimas em meio orgânico tem evoluído significativamente nos últimos vinte anos (VULFSON, 1994).

Tais estudos começaram com a investigação do comportamento das enzimas em sistemas predominantemente aquosos, os quais continham pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água. Posteriormente, desenvolveu-se sistemas enzimáticos para misturas de duas fases aquosa/orgânica e, em seguida, em meio orgânico contendo uma fase aquosa dispersa (microemulsões).

Atualmente, observa-se em um grande número de aplicações a utilização de suspensões enzimáticas em solventes orgânicos praticamente anidros. Nestes casos, as enzimas podem atuar em diferentes substratos e principalmente nas reações que dificilmente ocorreriam em meio aquoso, como a esterificação e as interesterificações (CASTRO e ANDERSON, 1995).

Uma das principais vantagens da catálise em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos formados por reagentes pouco solúveis em água. Além disso, é possível deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que seriam impossíveis em meio aquoso, pela extração dos substratos e/ou produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou pela diminuição da quantidade de água do meio reacional. Desta forma, reações como a esterificação e as interesterificações tornam-se viáveis industrialmente. Algumas vantagens da catálise enzimática em meio orgânico são listadas na TABELA 2.1 e descritas a seguir (MONOT, 1994).

TABELA 2.1- Vantagens da catálise enzimática em meio orgânico

Aumento da disponibilidade de substratos pouco solúveis em água;
Deslocamento do equilíbrio das reações;
Diminuição do número de reações indesejáveis;
Simplificação dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador;
Controle da estereoseletividade das reações enzimáticas;
Diminuição de eventuais inibições por substratos e produtos;
Aumento da estabilidade da enzima.

- ☛ Substratos não polares são processados mais rapidamente devido a alta solubilidade dos mesmos.
- ☛ Em meio orgânico o equilíbrio termodinâmico favorece a síntese. Com o uso de hidrolases, principalmente as lipases e as proteases, os ésteres e poliésteres e as lactonas e amidas podem ser sintetizados de maneiras químio, regio e enantioseletiva.
- ☛ Muitas das reações paralelas como a hidrólise de anidridos de ácidos, polimerização de quinonas, racemização de cianohidrinás ou migração de grupamento acila são evitadas, porque todas estas reações são dependentes de água.
- ☛ As enzimas são insolúveis em meio orgânico e podem ser recuperadas por filtração. Os processos conduzidos em meio orgânico são geralmente melhores, devido à não necessidade de uma etapa extra de extração durante a síntese. Portanto, a formação de emulsões pode ser evitada e a recuperação dos produtos é facilitada pelo uso de solventes orgânicos de baixo ponto de ebulição.

- ☛ Contrário ao que ocorre em meio aquoso, em meio orgânico a especificidade de uma enzima pode ser controlada pela simples variação das propriedades do solvente como momento de dipolo, solubilidade, ponto de ebulição entre outros, propiciando, desta forma, a escolha do melhor meio para imobilização.
- ☛ A desativação e/ou inibição da enzima causada por substratos e/ou produtos lipofílicos é minimizada, devido à solubilidade destes compostos no meio, favorecendo a sua migração para uma região fora da superfície da enzima. Além disso, não há contaminação por células vivas, favorecendo, desta maneira, as reações em escala industrial, onde muitas vezes a esterilidade do meio é de difícil manutenção;
- ☛ Muitas das reações responsáveis pela desnaturação das enzimas são reações hidrolíticas. Por isso em meio com baixo teor de água (orgânico), a estabilidade das enzimas é, provavelmente, melhor controlada.

Acredita-se, atualmente, que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque elas permanecem na sua conformação original (NARAYAN *et al.*, 1993). A proteína, em meio não aquoso, não é capaz de se desdobrar devido, em parte, ao aumento nas interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima quando em meio orgânico. Isto ocorre devido à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes e também devido ao aumento no número de pontes de hidrogênio intermoleculares. A integridade estrutural das proteínas em meio não aquoso tem sido verificada através de experimentos incluindo RMN¹⁵N, RMN¹³C do estado sólido e cristalografia de raios X (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996).

Portanto, um dos parâmetros mais complexos num processo de biotransformação está relacionado ao teor de água presente no meio reacional, que pode ter origem a partir de diversas fontes: i) água oriunda do solvente e substratos; ii) água presente na enzima, iii) água no suporte de imobilização (se presente) e iv) água

formada durante a reação (HALLING, 1990). Logo, a seleção da melhor condição para a realização de uma reação enzimática em meio não convencional, deve seguir uma cuidadosa manipulação do meio-ambiente do biocatalisador, de tal forma que a produtividade do sistema seja maximizada.

Isto pode ser alcançado pela utilização de solventes apropriados, remoção da água gerada durante a reação de esterificação e imobilização da enzima.

2.4.1- Seleção de Solventes

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima.

Os solventes menos nocivos às enzimas são os mais hidrofóbicos, por não interagirem significativamente com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos tendem a retirar a água essencial da camada protéica, levando à perda da atividade enzimática. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem substancialmente uma menor quantidade de água para obtenção de sua atividade máxima em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos (ZAKS e KLIBANOV, 1988). De acordo com resultados experimentais encontrados na literatura, pode-se concluir que a atividade enzimática em meio orgânico é primeiramente influenciada não pelas interações do solvente com a enzima propriamente dita, mas pelas interações com a água ligada à enzima.

Portanto, nos solventes hidrofóbicos, a atividade da enzima é muito maior do que nos seus correspondentes hidrofílicos, simplesmente porque o primeiro proporciona-lhe mais água.

As interações eletrostáticas podem ser preponderantes no controle do comportamento catalítico das enzimas em solvente orgânico. Essa hipótese é sustentada pela verificação no aumento da atividade enzimática após a adição de

substâncias formadoras de pontes de hidrogênio com o solvente, tais como glicerol e etileno-glicol. Foi constatado que nos solventes que contêm estes compostos há diminuição na tendência de ruptura das pontes de hidrogênio, que desempenham um importante papel na manutenção da estrutura terciária da lipase (MALCATA *et al.*, 1990).

Da mesma maneira que a água desempenha um papel crucial nas interações enzima-substrato, podendo alterar a especificidade das enzimas em meio não-aquoso, a rigidez estrutural conferida à enzima em meio orgânico pode permitir o controle do acesso do substrato ao sítio da enzima e o posicionamento do substrato em relação ao sítio ativo (MONOT, 1994).

Os critérios para a determinação da hidrofobicidade de um solvente estão sujeitos a controvérsias. A melhor classificação proposta foi baseada no valor do $\log P$, sendo P o coeficiente de partição de um certo solvente em um sistema binário constituído de octanol e água (LAANE *et al.*, 1987). Os solventes mais adequados são os que apresentam $\log P > 2,0$. Segundo CARTA *et al.* (1992) a biocatálise das reações de síntese, tais como as esterificações, é geralmente considerada possível em solventes imiscíveis em água, os quais apresentam $\log P > 4,0$.

Contudo, essa classificação não pode ser aplicada a todas as enzimas, tendo em vista que ela não considera as interações específicas entre a enzima e o solvente, as quais são função da constante dielétrica do mesmo. Admite-se que a redução da constante dielétrica do solvente permite o aumento das interações eletrostáticas entre os resíduos ionizáveis da molécula da enzima, o que pode causar uma redução da flexibilidade interna da proteína. Considerando que a mobilidade molecular é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma redução na sua flexibilidade é normalmente acompanhada por uma diminuição da atividade enzimática.

A modificação no valor da constante dielétrica também altera o valor do pK_a dos resíduos ionizáveis da superfície da proteína. Se essa modificação ocorrer no sítio ativo ou próximo a ele, pode haver a alteração da ligação e/ou da conversão dos

substratos e, quando a mudança na constante dielétrica é drástica, a estrutura tridimensional da enzima pode ser afetada. É importante ressaltar que a adição de substratos e a formação de produtos ao longo da reação podem modificar a hidrofobicidade do meio e, conseqüentemente, o teor de água ao redor da camada protéica (MONOT, 1994).

Além do efeito dos solventes na atividade, estabilidade e especificidade da enzima ou nas suas relações com a água, deve-se também considerar o efeito do solvente na constante de equilíbrio das reações. A condição de equilíbrio será determinada pelas interações entre os reagentes e os produtos e o solvente. A natureza e o comportamento de qualquer catalisador, biológico ou não, influenciará apenas na velocidade com que o sistema atinge o equilíbrio (HALLING, 1990).

É possível prever o efeito do solvente sobre o equilíbrio utilizando dados sobre a distribuição dos componentes nas fases do sistema líquido-líquido (HALLING, 1990). Substratos e produtos irão se dividir entre as fases nos sistemas de duas fases, isto é, orgânica e aquosa. O coeficiente de partição de um composto é geralmente definido como a razão entre suas concentrações na fase orgânica e aquosa. Para obter elevadas concentrações de produto é essencial utilizar um solvente orgânico para o qual o coeficiente de partição deste produto seja alto. Isto implica em uma eficiente extração do produto para a fase orgânica, o que produz uma conversão mais elevada (YANG e ROBB, 1994).

JANSSEN *et al.* (1993) estudaram a esterificação do glicerol e ácido decanóico em meio a vários solventes, incluindo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, éteres, cetonas, aldeídos, álcoois terciários e hidrocarbonetos halogenados. Os resultados indicaram que altas frações molares de monoéster e baixas frações molares de triéster são obtidas em solventes polares ($\log P < 1,0$). A adição de solventes menos polares provoca uma diminuição das frações molares de monoéster e em um aumento das frações molares do triéster.

No entanto, segundo esse mesmo grupo de pesquisadores, $\log P$ não é o único

parâmetro que controla a distribuição do produto. A solubilidade da água no solvente também é um parâmetro útil para a seleção do solvente. Outros critérios são a compatibilidade do solvente com o biocatalisador, a especificidade da enzima, o ponto de ebulição do solvente e a viscosidade.

2.4.2- Influência da Água nas Biotransformações Catalisadas por Lipases

Um fato bem estabelecido em todos os estudos sobre a utilização de enzimas em meio orgânico refere-se à quantidade de água ligada à enzima. Esse é um fator determinante para a expressão de suas propriedades como por exemplo, a atividade, a estabilidade e a especificidade. Embora num sistema enzimático em meio orgânico o teor de água seja baixo, pequenas variações no conteúdo de água provocam grandes modificações na atividade enzimática (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996). As enzimas são praticamente inativas em sistemas completamente anidros. A água, quando adicionada a esses sistemas, distribui-se entre o solvente e a enzima e a atividade enzimática é dependente da quantidade de água associada à enzima e, em menor grau, ao conteúdo total de água existente no sistema. Portanto, desde que uma quantidade mínima essencial de água esteja ligada à enzima, sua atividade é mantida.

A adição de água nas preparações enzimáticas sólidas em meio a solventes orgânicos pode aumentar a atividade da biocatalisador, através do aumento da polaridade e da flexibilidade do sítio ativo da enzima. No entanto, o excesso de água facilita a agregação da enzima e pode provocar um decréscimo em sua atividade. A remoção do excesso de água pode ser feita por técnicas adequadas como borbulhamento de nitrogênio ou ar, evaporação simples, utilização de peneiras moleculares, destilação simples ou a pressão reduzida (CASTRO e ANDERSON, 1995). Essa etapa parece ser necessária já que, em muitos casos, embora não altere significativamente o rendimento da reação, permite que o nível adequado de água seja mantido e leva a possível reutilização do derivado imobilizado.

O mecanismo de agregação da enzima induzido pela água, em meio orgânico, ainda não está totalmente esclarecido. Acredita-se que a formação de ligações dissulfeto intermoleculares seja uma das causas desse processo. A quantidade de água necessária para a manutenção da estrutura enzimática varia com a natureza da enzima (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996).

A hidratação dos grupos carregados e polares das moléculas de enzima parece ser um pré-requisito para a catálise enzimática. É possível que na ausência de água esses grupos se interajam, levando a uma conformação estrutural inativa. A função da água na manutenção da atividade enzimática parece estar relacionada com a sua capacidade de formar pontes de hidrogênio com esses grupos funcionais, protegendo dielétricamente as interações eletrostáticas entre os grupos ionizados e neutralizando as interações dipolo-dipolo entre as unidades peptídicas e os grupos vizinhos polares da proteína.

É previsível que a estabilidade da proteína em ambiente não aquoso deva ser sensivelmente diferente daquela em meio aquoso. Desde que as moléculas de água que circundam uma enzima em solução aquosa levam à formação das principais forças intermoleculares que estabilizam a conformação terciária, incluindo as interações do tipo van der Waals, pontes salinas e de hidrogênio, a remoção dessa água irá alterar a estabilidade da enzima.

O aumento da termoestabilidade enzimática em meio não aquoso tem sido amplamente comprovado para a maioria das enzimas. A remoção de água ligada à proteína aumenta a força das pontes de hidrogênio intramoleculares e das pontes salinas, estabilizando as proteínas nas suas conformações originais, conferindo-lhes rigidez estrutural. A desnaturação das enzimas através do calor requer ampla mobilidade conformacional, o que envolve água livre. Além disso, a eliminação da água do sistema dificulta a ocorrência de inúmeras reações químicas indesejáveis, as quais são promovidas através do aumento da temperatura, tais como, reações de hidrólise, de oxidação e de isomerização, levando à inativação da proteína em soluções

aquosas. Segundo KLIBANOV (1989), subtilisina e lipase pancreática suína são estáveis em temperaturas superiores a 100°C durante horas quando mantidas em solventes orgânicos anidros, ao passo que, em meio aquoso, as mesmas tornam-se inativas rapidamente, mesmo quando submetidas a temperaturas muito menores. Conclui-se, portanto, que a termoestabilidade decresce quando o teor de água no solvente aumenta.

2.5- Imobilização de Enzimas

Uma maneira eficiente de manter a atividade de uma enzima consiste em fixar a configuração nativa da mesma através do uso de técnicas de imobilização. A imobilização da enzima tem um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima (CASTRO e ANDERSON, 1995).

Enzimas imobilizadas pertencem, portanto, a uma classe de biocatalisadores na qual as proteínas estão fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região definida no espaço, com retenção de sua atividade catalítica (CHIBATA, 1978) e, de acordo com o «Working Party on Immobilized Biocatalysts» de 1982, são espécies ativas que se encontram num estado no qual é possível a sua reutilização (GUIDELINES, 1983).

A principal razão para que as enzimas sejam imobilizadas é seu alto custo. Portanto, se esta puder ser imobilizada em um suporte, sem perder a sua atividade por um certo período de tempo, poderá ser utilizada várias vezes, significando uma economia nos processos industriais.

A primeira imobilização ocorreu quando NELSON e GRIFFIN (1916), na Universidade de Columbia em Nova York, observaram que a invertase adsorvida em carvão catalisava a hidrólise da sacarose. Nessa época vários artigos foram publicados sobre proteínas ativas fisiologicamente e imobilizadas por ligação covalente em

diferentes suportes.

A fixação de moléculas biologicamente ativas em suportes sólidos e sua aplicação na indústria e em pesquisa abriu e consolidou este campo da biotecnologia, principalmente no período de 1950-1960.

Entretanto, enzimas imobilizadas não foram utilizadas na prática até 1953 quando GRUBHOFFER e SCHLEITH (1953), do Instituto de Pesquisa de Heidelberg, descreveram a primeira enzima imobilizada covalentemente e sua aplicação em coluna de cromatografia.

MANECKE (1962) dedicou-se por 30 anos ao desenvolvimento de polímeros para a imobilização de proteínas e à caracterização destes sistemas e já nesta época era categórico em dizer que "...Uma enzima imobilizada em uma resina pode converter um substrato sem contaminar o produto...".

A primeira aplicação industrial de enzimas imobilizadas data de 1969, quando aminoacilase fúngica foi imobilizada em DEAE-Sefadex através de ligação iônica e o derivado imobilizado foi aplicado na reação de hidrólise estereoseletiva de N- acil-D, L-aminoácidos para obter, L-aminoácidos e N- acil- D- aminoácidos (CHIBATA, 1978). A partir daí, outras indústrias concentraram seus esforços para o desenvolvimento de novas técnicas de produção usando enzimas imobilizadas (POULSEN, 1984).

Entre os efeitos causados pela imobilização de enzimas destacam-se (BULLOCK, 1989):

- o processo pode aumentar o potencial de uma enzima como catalisador em escala industrial;

- a imobilização pode ser utilizada como uma estratégia para a viabilidade econômica na utilização da enzima como catalisador pela melhoria em sua estabilidade;

- a perda de atividade geralmente resulta de mudanças conformacionais;

- o micro-ambiente ao redor de uma enzima imobilizada pode diferir daquele encontrado quando ela se encontra no estado livre.

As muitas maneiras pelas quais os sistemas imobilizados podem ser classificados dependem da definição utilizada para descrever uma enzima imobilizada. O termo enzima imobilizada inclui (KENNEDY e ROIG, 1995):

- > enzimas modificadas de tal forma a torná-las insolúveis em água através de técnicas apropriadas;
- > enzimas solúveis usadas em reatores equipados com membrana de ultrafiltração semi-permeável, permitindo a passagem dos produtos de reação, formados a partir de hidrólise de substratos de alto peso molecular com retenção das moléculas de enzima no reator;
- > enzimas ligadas a uma outra macromolécula, restringindo assim sua mobilidade, embora o composto como um todo, continue solúvel em água.

A FIGURA 2.3 apresenta uma das possíveis formas de classificação dos métodos de imobilização de enzimas. Esta foi sugerida por KENNEDY e ROIG (1995), e procura combinar a natureza das interações entre enzima e suporte, responsáveis pela imobilização.

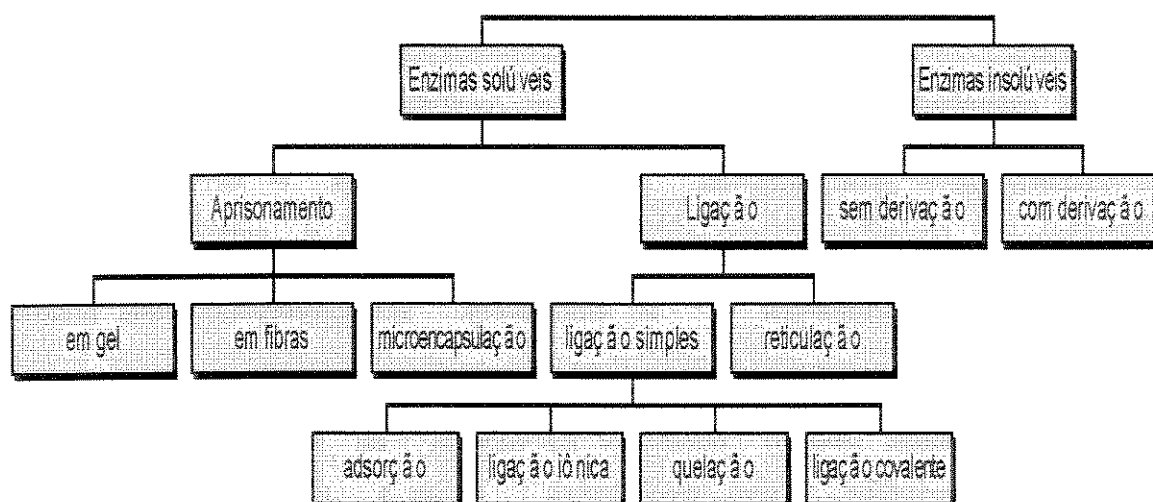


FIGURA 2.3- Classificação dos métodos para imobilização de enzimas

2.5.1-Principais Métodos de Imobilização

2.5.1.1-Aprisionamento

Este método, também conhecido como método da oclusão, envolve o confinamento da enzima dentro dos espaços intersticiais das ligações covalentes cruzadas de um polímero insolúvel. A grande vantagem deste método é que a enzima não sofre nenhuma modificação, pois a imobilização praticamente não altera a sua estrutura. No entanto, pode ocorrer a perda de parte da enzima, causada pela variação do tamanho dos poros intersticiais do polímero durante a aplicação do derivado imobilizado.

O aprisionamento em gel envolve o “encaixe” das enzimas dentro dos espaços intersticiais de polímeros do tipo gel, reticulados e insolúveis em água. O microencapsulamento de enzimas envolve seu confinamento em pequenas esferas (microcápsulas) de membranas semipermeáveis com poros variando de 5 a 300 Å, que permite somente a movimentação livre de substratos e produtos da reação enzimática. Este tipo de imobilização difere do aprisionamento por permitir a retenção de um volume ou número de moléculas maior, levando à possibilidade de uma interação enzimática. Este método oferece como vantagens a manutenção de um alto grau de atividade da enzima e a possibilidade da imobilização simultânea de várias enzimas em apenas uma etapa. Por outro lado, a necessidade de alta concentração de enzima para o microencapsulamento e a restrição da passagem de substratos através dos poros de uma membrana, por exemplo, constituem desvantagem do método.

2.5.1.2- Adsorção

A adsorção física é o meio artificial mais antigo utilizado para a imobilização de enzimas. É o método mais fácil para se preparar um sistema imobilizado, estando

baseado na adsorção das moléculas de enzima sobre a superfície de matrizes sólidas. A técnica consiste em colocar em contato uma solução aquosa de enzima e um suporte, realizado através dos seguintes procedimentos: i) procedimento estático; ii) eletrodeposição; iii) processo reator-carga e iv) mistura ou agitação da carga (KENNEDY e ROIG, 1995).

Das quatro técnicas, a mais freqüentemente empregada para preparação de imobilizados em laboratório é a de mistura ou agitação, realizada pela adição do suporte à solução enzimática sob agitação constante, resultando em uma carga uniforme de enzima.

Dentre as vantagens deste método podem ser apontadas a simplicidade do próprio método, a estabilidade da conformação da enzima e a conservação do seu sítio ativo. Por não haver o envolvimento de nenhuma espécie reativa, o método permite a obtenção de um sistema imobilizado com atividade específica semelhante à da enzima livre (CHIBATA, 1978).

Por outro lado, a grande desvantagem deste procedimento de imobilização é que a enzima adsorvida é extremamente dependente de fatores experimentais como pH, natureza do solvente, meio utilizado para a imobilização, quantidade de enzima, tempo de contato e temperatura. Assim, um controle rigoroso dessas variáveis é necessário para que as fracas forças entre a proteína e o adsorventes (pontes de Hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, etc) sejam mantidas por um bom período de tempo (KENNEDY e ROIG, 1995). Além disso, a adsorção na superfície é não específica e portanto poderá adsorver outras proteínas ou outras substâncias que poderão interferir na utilização do imobilizado. Este fato deve alterar as propriedades da enzima imobilizada ou, se a substância adsorvida for um substrato para a enzima, a velocidade provavelmente decrescerá dependendo da mobilidade superficial da enzima e substrato (McLAREN e ESTERMANN, 1956).

Os fatores envolvidos na imobilização por adsorção podem ser especificados como segue (MESSING, 1976):

- ↳ quantidade de enzima versus área superficial ou massa de suporte;
- ↳ efeito da adsorção sobre a enzima;
- ↳ força iônica;
- ↳ pH de adsorção e subsequente pH de aplicação;
- ↳ temperatura de adsorção;
- ↳ ponto isoelétrico da enzima e sítios de adsorção do suporte

2.5.1.3- Ligação Iônica

A imobilização via ligação iônica baseia-se, principalmente, na ligação iônica entre as moléculas de enzima e os suportes que contêm resíduos trocadores de íons. Em alguns casos a adsorção pode ocorrer simultaneamente. A principal diferença entre a ligação iônica e a adsorção é a intensidade das forças de ligação entre a enzima e o suporte, a qual é mais forte nas ligações iônicas. O procedimento de imobilização é bem semelhante ao da adsorção.

Apesar da natureza iônica das forças de ligação, pode haver desprendimento de moléculas de enzima do suporte em algumas situações. Por outro lado, a mesmas vantagens são encontradas nesse método, principalmente com relação à alta atividade enzimática dos derivados imobilizados.

Os suportes usados para ligações iônicas com as enzimas são as substâncias trocadoras de íons preparadas freqüentemente a partir de compostos orgânicos, como os polímeros derivados de polissacarídeos ou os polímeros sintéticos derivados principalmente do poliestireno.

2.5.1.4- Quelação

Esta técnica envolve o uso de compostos de metais de transição como ativadores da superfície do suporte, levando a uma ligação direta da enzima, sem a derivação do

suporte ativado, através da formação de quelatos.

Apesar do método ser classificado como quelação, certos autores preferem classifica-lo como parcialmente covalente e devido à possibilidade de ocorrer a desorção sob certas condições de operação ou depois de um determinado período em estoque, alguns autores classificam o método como sendo de adsorção. Porém, estudos mais recentes sobre a quelação mostraram bons resultados de atividade e alto grau de estabilidade operacional do derivado imobilizado (CABRAL *et al.*, 1982).

2.5.1.5- Ligação Covalente

O método da ligação covalente consiste em promover esse tipo de ligação entre as enzimas e suportes pelos grupos nucleófilos funcionais das enzimas ($-NH_2$, $-SH$ e $-OH$) e os grupos reativos da matriz como aldeído, amino, diazônio, azida ácida, isocianatos e haletos.

As condições de reação necessárias para a formação dessas ligações são normalmente drásticas. Em alguns casos a ligação covalente altera a estrutura conformacional, provocando, conseqüentemente, a redução da atividade enzimática e uma mudança na especificidade da enzima. Entretanto a enzima mantém-se firmemente ligada ao suporte, pois a energia de ligação é alta.

Fatores tais como capacidade de ligação química, facilidade de ligação química e a estabilidade do suporte são obviamente importantes. O processo de ligação envolve a formação de um intermediário reativo no suporte, o qual subseqüentemente reage com a enzima. Embora resulte num sistema imobilizado estável, há o risco da enzima ser desativada durante o tratamento químico.

2.5.1.6- Reticulação ou Ligação Covalente Cruzada

Baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação

de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima por meio de reagentes bi- ou multifuncionais, levando a um agregado reticulado tridimensional que é completamente insolúvel em água.

Um reagente típico bifuncional é o glutaraldeído, que atua como agente de reticulação pela reação com os grupos amino da enzima, mantendo-a desta forma num ambiente semelhante ao encontrado na natureza. Desta forma, confere-lhe boa estabilidade frente as variações de pH, temperatura, força iônica e natureza do solvente.

2.5.2- Imobilização da Lipase

A seleção do melhor método de imobilização pode estar baseada em parâmetros como atividade global do imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a lipase imobilizada (MALCATA *et al.*, 1990).

Há uma extensa literatura sobre a imobilização de lipases e os métodos utilizados abrangem todas as possibilidades de imobilização: ligação covalente, adsorção, encapsulação e reticulação. A TABELA 2.2 apresenta alguns exemplos de métodos de imobilização de lipase e revisões abrangentes sobre imobilização de lipases podem ser encontradas nos trabalhos publicados por MALCATA *et al.* (1990) e BALCÃO *et al.* (1996).

Deve ser ainda notado que, atualmente, diversas preparações de lipase imobilizada já são encontradas disponíveis comercialmente, entre as quais destaca-se a preparação comercializada pela NOVO INDUSTRI (1986), sob a denominação de Lipozyme. Esta preparação tem sido extensivamente empregada em trabalhos de pesquisa, notadamente na produção de ésteres formadores de aroma e pode ser considerada como uma referencia em preparação enzimática (CASTRO e ANDERSON, 1995).

A imobilização por adsorção física é talvez o procedimento mais empregado na

imobilização de lipase. Esta metodologia tem sido aplicada com sucesso para imobilização de lipases através do uso de reatores de membranas ou colunas com enchimento de fibras e pó. A imobilização de lipase em membranas tem sido efetuada por percolação de uma solução tamponada com lipase através da membrana ou sobre a superfície de membrana antes de iniciar a reação, bem como através do contato contínuo da membrana com a solução de lipase. Esta adsorção pode ser realizada em meio aquoso ou por imersão da membrana hidrofóbica em ácidos graxos ou óleo antes de sua exposição com a solução de lipase livre (HOQ *et al.*, 1984).

O procedimento padrão para imobilização de lipase em suporte na forma de pó consiste na dissolução da lipase em solução tampão, mistura desta solução com o referido suporte através da agitação em um becker ou percolação em uma coluna empacotada, remoção da solução sobrenadante por filtração ou drenagem simples e secagem da lipase imobilizada para armazenamento (MALCATA *et al.*, 1990).

Variações nesses procedimentos incluem imobilização por precipitação da lipase numa solução tampão com acetona resfriada, forçando desta maneira a adsorção da lipase na superfície das partículas do suporte, seguido de uma secagem a vácuo (. As lipases também tem sido imobilizadas pela dispersão de uma solução tamponada com lipase sobre o suporte a pressão de vapor reduzida (MALCATA *et al.*, 1990).

TABELA 2.2- Exemplos de métodos para imobilização de lipase (BALCÃO *et al.*, 1996).

| <i>Fonte de lipase</i> | <i>Imobilização</i> | <i>Tipo de reação</i> | <i>Substrato</i> |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|
| <i>Candida cylindracea</i> | Adsorção | Síntese de ésteres | Ácido láurico/metanol |
| <i>Candida rugosa</i> | Ligação covalente | Hidrólise | Azeite de oliva/água |
| Pâncreas bovino | Precipitação | Alcoólise | Tributirina/álc. benzílico |
| <i>Rhizopus arrhizus</i> | Encapsulação | Hidrólise | Gordura do leite/ Água |
| <i>Mucor miehei</i> | Reticulação | Interesterificação | Ácido esteárico/ trioleína |

2.5.3- Suportes para Imobilização de Lipase

O suporte ideal para uma aplicação específica é aquele que deve ter afinidade ao substrato, não inibir o produto, não alterar o pH do meio, não permitir crescimento microbiano e ser de fácil recuperação para posterior reutilização (MESSING, 1975).

Dados da literatura sugerem que suportes porosos com grande superfície interna ativada, com densas camadas de grupos altamente hidrofóbicos, podem ser reconhecidos pelas lipases, em nível molecular, como interfaces sólidas. Desta maneira, as lipases podem ser imobilizadas em tais suportes levando a “estruturas imobilizaas abertas” (BASTIDA *et al.*, 1998).

A escolha de um suporte para a imobilização de lipase é dependente de algumas características como resistência mecânica, estabilidade térmica, durabilidade química, funcionalidade química, caráter hidrofóbico/hidrofílico (RUA *et al.*, 1993,OTERO *et al.*, 1990), facilidade de regeneração e custo (MALCATA *et al.*, 1990). Além disso, a morfologia do suporte é extremamente importante, principalmente com relação à superfície de contato e porosidade, fatores que afetam o desempenho da enzima e são essenciais no processo de imobilização.

No caso particular da lipase para uso em meio orgânico, a seleção do suporte de imobilização é um fator crucial do processo. Nesses sistemas há pelo menos três tipos de ambiente com características bem distintas: i) a fase orgânica, constituída pelo solvente, ii) camada protéica sobre o suporte e iii) o material do suporte propriamente dito. Em termos de volume, as fases constituídas pelo suporte e solvente predominam, enquanto uma parte relativamente menor, constituída da fase protéica, forma o micro-ambiente do biocatalisador (FIGURA 2.4).

De acordo com a literatura, nos últimos anos, muitos e diferentes suportes têm sido usados em imobilização, conforme pode ser observado nos exemplos da TABELA 2.3.

De acordo com sua composição os suportes podem ser classificados em não

porosos e porosos (porosidade controlada; porosidade distribuída e estrutura de gel).

Os suportes porosos, orgânicos ou inorgânicos, são encontrados facilmente no mercado e apresentam certas vantagens para sua utilização como grande área para imobilização, proteção da enzima e carga superficial oposta à da enzima, podendo atrair o substrato.

Os suportes hidrofílicos são geralmente caracterizados por altas perdas de atividade da lipase na imobilização. Estas perdas podem ser atribuídas aos seguintes fatores: i) mudanças na conformação da lipase adsorvida, resultando na redução de sua atividade; ii) uma situação em que somente uma pequena quantidade de lipase é imobilizada; iii) um decréscimo na habilidade de substratos hidrofóbicos para alcançar o sítio ativo da lipase, iv) existência de um impedimento estérico imposto pelo suporte restringindo a flexibilidade na molécula de lipase (MALCATA *et al.*, 1990).

São geralmente adotados procedimentos experimentais similares para a adsorção física da lipase em suportes hidrofóbicos ou hidrofílicos. Pequenas variações incluem a suspensão do suporte em mistura de água/ álcool, lavagem com água e tampão em uma coluna empacotada e finalmente percolação da solução de lipase através de uma coluna (PEDERSEN e REESENSVEJ, 1990), modificação química da molécula de enzima (BASRI *et al.*, 1991), adição do suporte a uma solução aquosa enzimática e remoção da água por evaporação a pressão reduzida (WEHTJE *et al.*, 1993) e suspensão do suporte em um solvente orgânico seguido de adição da lipase em pó (MUSTRANTA *et al.*, 1993).

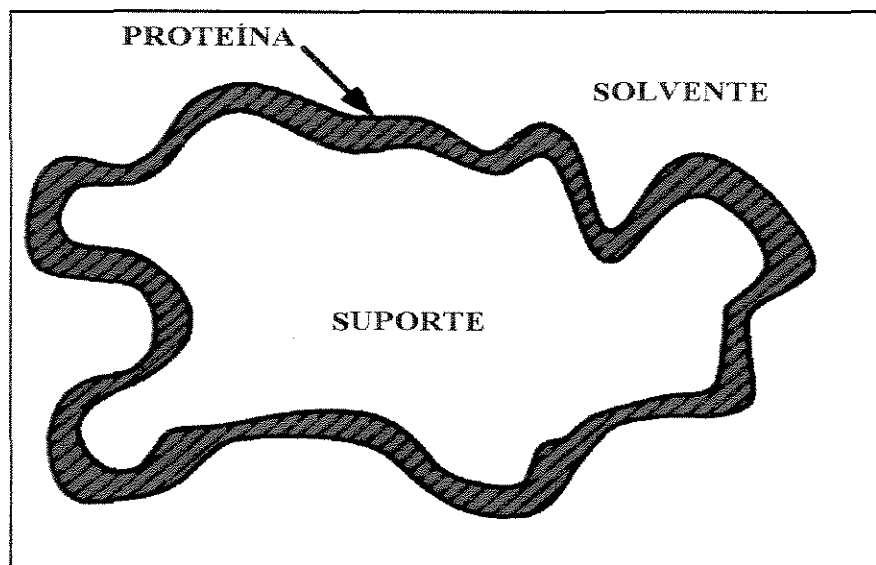


FIGURA 2.4 – Representação esquemática da enzima adsorvida em um suporte sólido e utilizada em meio a solvente orgânico (MATTIASSON e ADLERCREUTZ, 1991)

TABELA 2.3- Exemplos de suportes e procedimentos de imobilização de lipases (MALCATA *et al.*, 1990; BALCÃO *et al.*, 1996).

| <i>Tipo do suporte</i> | <i>Exemplo</i> | <i>Procedimento de Imobilização</i> |
|------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| Inorgânico | Terra diatomácea | Adsorção |
| | Sílica e derivados | Adsorção/Ligação Covalente |
| | Hidróxido de Zircônio | Adsorção |
| | Alginato de sódio | Encapsulação |
| Orgânico | Quitina | Ligação Covalente |
| | Poliuretano | Ligação Covalente |
| | Celulose | Adsorção |
| | Resinas sintéticas | Adsorção |

No campo dos suportes porosos as resinas poliméricas têm sido usadas extensivamente como suportes para as lipases. Entre as técnicas de imobilização pode-se citar:

- a mistura do pré-polímero com um foto-sensibilizador, como o etil eterbenzóico e, após a fusão da mistura, uma solução de lipase é adicionada, sendo obtida então uma preparação gelatinosa por exposição à radiação ultravioleta (FUKUI *et al.*, 1987).
- tratamento do suporte, como o polipropileno em pó, com solventes polares como etanol, isopropanol, metanol, acetona ou tetrahidrofurano, antes da etapa de adsorção. Apesar do uso de solventes polares normalmente diminuir o tempo necessário de adsorção, a ausência deste tratamento pode favorecer a obtenção de uma preparação imobilizada com atividade mais elevada. Portanto, um pré-tratamento com solventes polares nem sempre é necessário e vantajoso (BRADY *et al.*, 1987).
- percolação de solução tamponada contendo a lipase numa temperatura de 5°C através de uma coluna empacotada com uma resina trocadora de íons, como a Duolite, num pH=6, utilizando um longo período de contato (MALCATA *et al.*, 1990).
- imobilizações por ligações cruzadas, onde as moléculas de lipase são quimicamente ligadas umas as outras, pelo uso de reagentes bifuncionais. Um procedimento comum consiste de uma etapa preliminar envolvendo imobilização em uma resina de troca iônica (ex: Dowex ou Amberlite), para obter uma alta carga de lipase, seguido por uma ou mais etapas, nas quais são formadas as ligações covalentes (MALCATA *et al.*, 1990).

Neste trabalho utilizou-se suportes orgânicos, porosos e de natureza polimérica, para imobilização de lipase microbiana por adsorção física.

2.5.4-Suportes Poliméricos

Diferentes métodos de imobilização têm empregado diferentes suportes de natureza polimérica. A literatura mostra inúmeros trabalhos que utilizaram diversas matrizes poliméricas como Amberlite (XAD2, XAD4, XAD7 e XAD8), poli (ácido carboxílico) e poliacrilonitrila (BASRI *et al.*, 1994).

A estrutura morfológica destes materiais exerce grande influência no desempenho dos polímeros, principalmente os reticulados, em suas diferentes aplicações. Para adsorventes de compostos orgânicos tanto a estrutura química como a porosidade afetam diretamente a capacidade total e a seletividade da adsorção. Este efeito tem sido demonstrado para adsorventes poliméricos utilizados no tratamento de resíduos industriais e em colunas para cromatografia em fase gasosa (COPPI e BETTI, 1985).

Vários trabalhos têm mostrado os efeitos da porosidade total, da distribuição de tamanhos de poros, da área específica e da capacidade de inchamento no acesso dos sítios ativos e catalíticos de reagentes e catalisadores suportados em polímeros reticulados (SHERRINGTON, 1982).

Até o presente, não existe uma explicação completa para formação de estruturas macroporosas que relacione a influência dos principais parâmetros de síntese com a textura de um polímero reticulado nas diferentes etapas do processo de formação, bem como, no seu estado final.

De acordo com a teoria de DUSEK (1971), a formação de estruturas porosas em copolímeros é um processo de microsinérese ou de separação de fase. Nesta teoria, a separação de fases do sistema diluente-polímero pode ser induzida pelo aumento do grau de ligações cruzadas ou pela redução do poder solvatante do diluente.

KUN e KUNIN (1968) propuseram um mecanismo para a formação de estruturas macroporosas como um processo de três estágios.

Primeiramente, na polimerização dos monômeros em suspensão aquosa, cada

gota de fase orgânica (monômeros + diluentes) pode ser considerada como uma polimerização em massa individual, que resulta em pérola de copolímero. Durante os primeiros estágios da polimerização formam-se cadeias poliméricas com grupos vinila pendentes.

Com o progresso da polimerização são formados microgéis com ligações cruzadas intramoleculares e cadeias lineares de alto peso molecular que são ainda solúveis no sistema monômero-diluyente. Em seguida, ocorre uma separação de fases inicial que origina uma fase rica em polímero e uma fase diluyente com baixa concentração de polímero. Os monômeros ficam distribuídos entre as duas fases. Como os microgéis precipitados são constituídos de cadeias de polímero bastante solvatadas e com baixo grau de ligações cruzadas, eles podem se comportar como líquidos.

Desse modo, a tensão interfacial na fase rica em polímero produz formas esféricas de mais baixa energia, tal que o copolímero precipita na forma de microgéis esféricos. Em uma dada conversão, ocorre a macrogelação, isto é, a formação de pérolas do tipo gel constituídas de aglomerados de microgéis. O primeiro estágio na formação da estrutura macroporosa é, portanto, a produção e aglomeração de microesferas tipo gel seguido da interligação das microesferas através da polimerização dos monômeros que solvatam as cadeias poliméricas na superfície das mesmas.

Como última etapa, o monômero residual é polimerizado pelo aquecimento da mistura reacional para remoção do diluyente.

SEDEREL e DE JONG (1973) descreveram resumidamente a formação de estruturas macroporosas também como um processo em três estágios caracterizados por: formação das microesferas, aglomeração das microesferas e fixação dos aglomerados no interior da pérola. Os espaços entre as microesferas e suas aglomerações são chamados de macroporos (FIGURA 2.5).

Usualmente, os poros de adsorventes e catalisadores são classificados como: microporos (diâmetro $< 50\text{\AA}$), mesoporos ($50 - 250\text{\AA}$) e macroporos ($> 500\text{\AA}$). Na

literatura os copolímeros macroporosos não são bem definidos de modo que alguns autores preferem usar o termo “macrorreticular” para indicar a existência de uma porosidade não-gel (KUN e KUNIN, 1967).

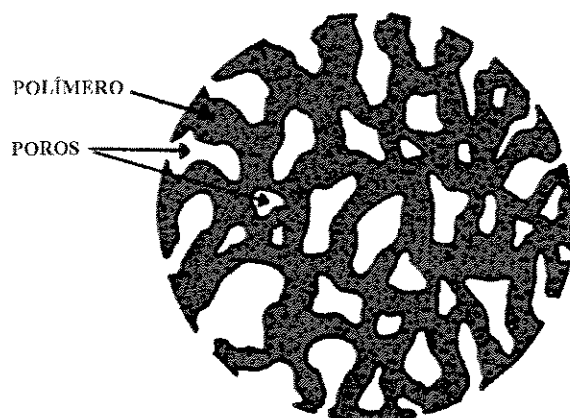


FIGURA 2.5- Representação esquemática da estrutura macroporosa de uma pérola de copolímero de estireno com divinilbenzeno.

Vários autores denominam como copolímeros macroporosos qualquer polímero reticulado sintetizado na presença de um diluente, mesmo que a estrutura final não seja propriamente porosa (JACOBELLI et al., 1979). Os copolímeros podem ser classificados como dentro ou fora do domínio macroporoso, de acordo com suas propriedades físicas. MILLAR et al. (1963) definiram a macroporosidade como sendo a capacidade dos copolímeros em reterem mais de $0,1 \text{ cm}^3$ de um não-solvente por grama de copolímero seco.

HAEUPKE e PIENTKA (1974) descreveram um domínio macroporoso cujas propriedades, comparadas com as de outros domínios, apresentam como principal diferença uma área específica mensurável. Por outro lado, os domínios porosos, de acordo com as propriedades físicas dos copolímeros, não apresentam limites bem

definidos. Isto significa que na passagem do domínio gel para o domínio macroporoso, os copolímeros podem apresentar características intermediárias, de modo que estes podem ser classificados como pertencentes a um domínio de transição (MIKES, 1970).

No campo da biotecnologia, os copolímeros reticulados do tipo gel e macroporosos são utilizados na imobilização de enzimas (KOLARZ *et al.*, 1990) e na síntese de peptídeos em fase sólida (ARSHADY e FALLAH, 1992), onde a estrutura morfológica deve ser também convenientemente controlada.

2.5.4.1-Resina n-metilolacrilamida

As amino resinas são polímeros termofixos obtidos a partir da reação de condensação de aldeídos com compostos contendo grupos amino ($-NH_2$). A resina de N-metilolacrilamida (FIGURA 2.6) é obtida a partir da reação entre acrilamida e formaldeído, sendo normalmente preparada, estocada, transportada e vendida preferencialmente na concentração de 40 a 80% de N-metilolacrilamida (CYANAMID, 1987).

Um aspecto interessante desta resina é o fato da mesma possuir dois grupos funcionais diferentes: vinil e hidroximetilol ou metilol. Assim, esta resina pode ser copolimerizada com monômeros vinílicos ou com um homopolímero, pela polimerização em cadeia ou por adição, iniciada por radicais livres, através da função vinílica (PERES, 1986).

A N-metilolacrilamida é utilizada como adesivo na forma de homopolímero; como acrílico e como acrílico plástico modificado, semirígido e rígido, quando copolimerizada com outros monômeros e como meio filtrante, quando copolimerizada com etilacrilato somente ou com outros monômeros (CYANAMID, 1987).

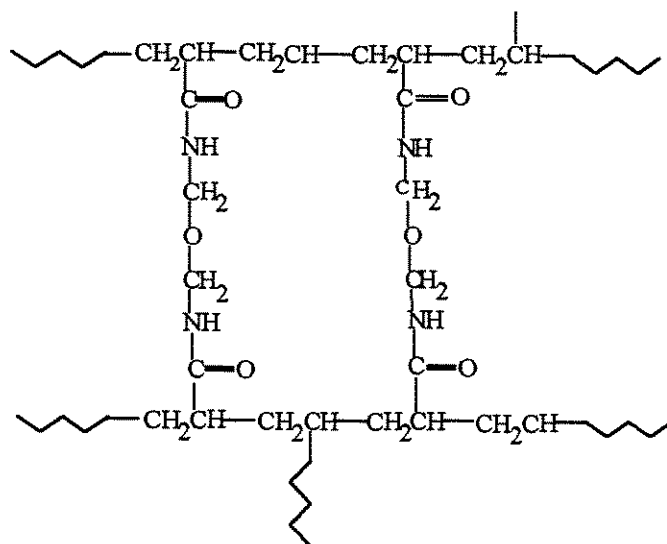


FIGURA 2.6- Estrutura da resina de N-metilolacrilamida (BALTIERI, 1996)

Através dos grupos metilol livres, o monômero da N-metilolacrilamida pode se fixar quimicamente em suportes como a celulose, podendo ser reticulados através de funções vinílicas pendentes, que podem também reagir com as hidroxilas livres do suporte.

São poucos os trabalhos de literatura que reportam experiência do uso dessa resina como suporte para imobilização de lipase, entre esses destaca-se o trabalho desenvolvido anteriormente na UNICAMP no qual a enzima lipase foi imobilizada em esferas macroporosas de polimetilolacrilamida e o derivado imobilizado foi aplicado na reação de transesterificação de 3-benziloxi-1,2-propanodiol com acetato de vinila (BALTIERI, 1996).

2.5.4.2-Copolímeros de Estireno e Divinilbenzeno

Copolímeros a base de estireno e divinilbenzeno (STYDVB) começaram a ser aplicados como suporte poliméricos precursores de resinas de troca iônica na década de

40 (ABRAHANS e BENEZRA, 1967).

A possibilidade de introdução de uma grande variedade de grupos iônicos nos anéis aromáticos da estrutura polimérica permitiu um avanço espetacular nas aplicações científicas e tecnológicas das resinas de troca iônica sintéticas (ALBRIGHT e IARNELL, 1986).

Atualmente, copolímeros a base de estireno e divinilbenzeno clorometilados ainda são base para síntese de um grande número de novas resinas quelantes (BICAK *et al.*, 1992).

Os primeiros copolímeros a base de estireno e divinilbenzeno economicamente disponíveis são conhecidos como resinas convencionais do tipo gel ou macrorreticulares. Uma resina do tipo gel apresenta uma estrutura porosa definida como a distância entre as cadeias poliméricas no estado inchado (KUN e KUNIN, 1967). A permeabilidade a um determinado íon depende fundamentalmente do inchamento e do grau de ligações cruzadas da matriz polimérica (TAGER, 1972).

O desenvolvimento de copolímeros a base de estireno e divinilbenzeno macroporosos a partir da década de 60 forneceu uma série de novos suportes para resinas de troca iônica com propriedades especiais. Os copolímeros macroporosos, também denominados macrorreticulares, apresentam uma porosidade não-gel, isto é, vazios ao lado da porosidade gel convencional. Estes vazios formam um sistema intercomunicante de canais entre aglomerados de partículas esféricas do tipo gel (KUN e KUNIN, 1967).

A estrutura física e as propriedades dos copolímeros macroporosos ampliaram as possibilidades de aplicação não somente dentro do campo da troca iônica, mas também em novas áreas de aplicação como adsorção de compostos orgânicos, cromatografia em fase gasosa, cromatografia de permeação em gel, catálise, síntese orgânica e biotecnologia (MILLAR, 1980).

Devido à grande variedade de aplicações, a utilização de polímeros reticulados macroporosos não se limita exclusivamente aos copolímeros a base de estireno e

divinilbenzeno e seus derivados. O desenvolvimento de suportes poliméricos macroporosos a partir de monômeros vinílicos que contém grupos substituintes ionizáveis ou quimicamente ativos tem recebido atenção especial, principalmente para se reduzir ou evitar as transformações químicas usualmente realizadas em copolímeros à base de estireno e divinilbenzeno.

Embora os polímeros reticulados a base de monômeros funcionalizados como ácido acrílico e metacrílico e seus ésteres possam ser utilizados sem modificação química, os copolímeros a base de estireno e divinilbenzeno ainda são os polímeros reticulados mais empregados como suportes para catalisadores (PARK e IHM, 1992).

A estrutura morfológica exerce grande influência no desempenho dos polímeros reticulados macroporosos em suas diferentes aplicações. Para adsorventes de compostos orgânicos tanto a estrutura química como a porosidade afetam diretamente a capacidade total e a seletividade da adsorção. Este efeito tem sido demonstrado para adsorventes poliméricos utilizados no tratamento de resíduos industriais e em colunas para cromatografia em fase gasosa (COPPI e BETTI, 1985; PELZBAUER *et al.*, 1979). Vários trabalhos têm mostrado os efeitos da porosidade total, da distribuição de tamanhos de poros, da área específica e da capacidade de inchamento no acesso dos sítios ativos e catalíticos de reagentes e catalisadores suportados em polímeros reticulados (SHERRINGTON, 1982).

A partir de meados deste século, o interesse na utilização de polímeros macroporosos como suportes para cromatografia e catálise e para a preparação de resinas de troca iônica tem sido cada vez maior. Isso se deve ao fato dos produtos preparados tendo como base esses materiais apresentarem características mecânicas, químicas e de equilíbrio especiais em relação aos copolímeros na forma de géis convencionais.

Os primeiros trocadores iônicos sintéticos, desenvolvidos em 1935 por Adams e Holmes para tratamento de água, foram obtidos através de reações de policondensação. Esses produtos eram polímeros a base de fenol e/ou seus derivados e formaldeído no

caso de resinas de troca catiônica, ou produtos de condensação de aminas aromáticas, geralmente m-fenilenodiamina com formaldeído, para o caso de resinas de troca aniônica (ABRAMS e BENEZRA, 1967; WHEATON e SLAMSTER, 1981; ALBRIGHT e IARNELL, 1986).

No período de 1935 a 1945 surgiram no mercado diversas resinas obtidas através de reações de policondensação. O período de 1940 a 1965 foi marcado por um rápido desenvolvimento de polímeros de troca iônica obtidos através de reações de poliadição, principalmente a base de estireno e divinilbenzeno (ABRAMS e BENEZRA, 1967).

A introdução da técnica de polimerização em suspensão para a obtenção de copolímeros a base de estireno e divinilbenzeno permitiu o controle do tamanho de partícula e da porosidade da estrutura (WHEATON e SLAMSTER, 1981). Na polimerização em suspensão os monômeros estão suspensos como uma fase descontínua em uma fase contínua líquida formando gotas monoméricas. Cada gota da fase orgânica se comporta como se fosse uma polimerização individual, resultando numa pérola de copolímero. Cada gota é constituída pelos monômeros, pelo iniciador e pelo diluente. A fase contínua é normalmente água, sendo os monômeros insolúveis nesta fase. O iniciador a ser escolhido deve ser solúvel nos monômeros utilizados. As gotas monoméricas formadas são termodinamicamente instáveis e sua coalescência é evitada pelo balanço entre o sistema de agitação e o agente de suspensão utilizado (BROOKS, 1990).

A morfologia dos copolímeros de STYDVB pode ser modificada através da adição de compostos inertes à fase orgânica. Estes copolímeros podem apresentar uma porosidade não gel que é função do tipo de composto inerte utilizado.

Na literatura, de acordo com SEDEREL e JONG (1973) são descritos três métodos para a obtenção de matrizes porosas de STY-DVB:

⇒ adição de um diluente solvatante em relação aos monômeros e polímeros correspondentes à mistura de monômeros, que resulta num copolímero do tipo PS (poroso pela ação do solvente), caracterizado geralmente por um volume de poros relativamente pequeno de até $0,8 \text{ cm}^3/\text{g}$ e área superficial específica na faixa de 50 a $500 \text{ m}^2/\text{g}$ e diâmetro médio de poro pequeno ($< 50 \text{ \AA}$);

⇒ adição de um diluente não solvatante, como o n-heptano, que resulta num copolímero do tipo PP (poroso pela ação de um precipitante), caracterizado por um volume de poro na faixa de $0,6$ a $20 \text{ cm}^3/\text{g}$, área superficial específica na faixa de 10 a $100 \text{ m}^2/\text{g}$ e diâmetro médio de poro relativamente grande ($> 250 \text{ \AA}$);

⇒ adição de um polímero linear, como o poliestireno, que resulta num copolímero do tipo PM (poroso pela ação de um composto macromolecular), caracterizado por um volume de poros até $0,5 \text{ cm}^3/\text{g}$, área superficial específica na faixa de 0 a $10 \text{ m}^2/\text{g}$ e diâmetro médio de poro grande ($> 500 \text{ \AA}$).

A porosidade dos copolímeros de STY-DVB é dependente da concentração do agente de reticulação, do tipo e da concentração do diluente e da temperatura do meio reacional. Entretanto, a interação entre o diluente e o polímero (afinidade termodinâmica) tem demonstrado ser o fator mais importante na formação da estrutura porosa (NEVES, 1996).

As resinas de troca iônica constituídas de estireno e divinilbenzeno são suportes porosos e hidrofóbicos, com potencial para um bom desempenho na imobilização de lipases, como mostra o trabalho de RUCKENSTEIN e WANG (1993). O trabalho de GANDHI *et al.* (1996) mostra que a resina de STYDVB além de ser um bom suporte, aumentou a estabilidade térmica da enzima.

Neste trabalho foi utilizado um copolímero de estireno empregando 45% de divinilbenzeno, de estrutura macroporosa, sintetizado por polimerização em suspensão

empregando 80% de diluição e heptano puro como diluente (FIGURA 2.7) de acordo com metodologia desenvolvida no Instituto de Macromoléculas- IMA (NEVES, 1996).

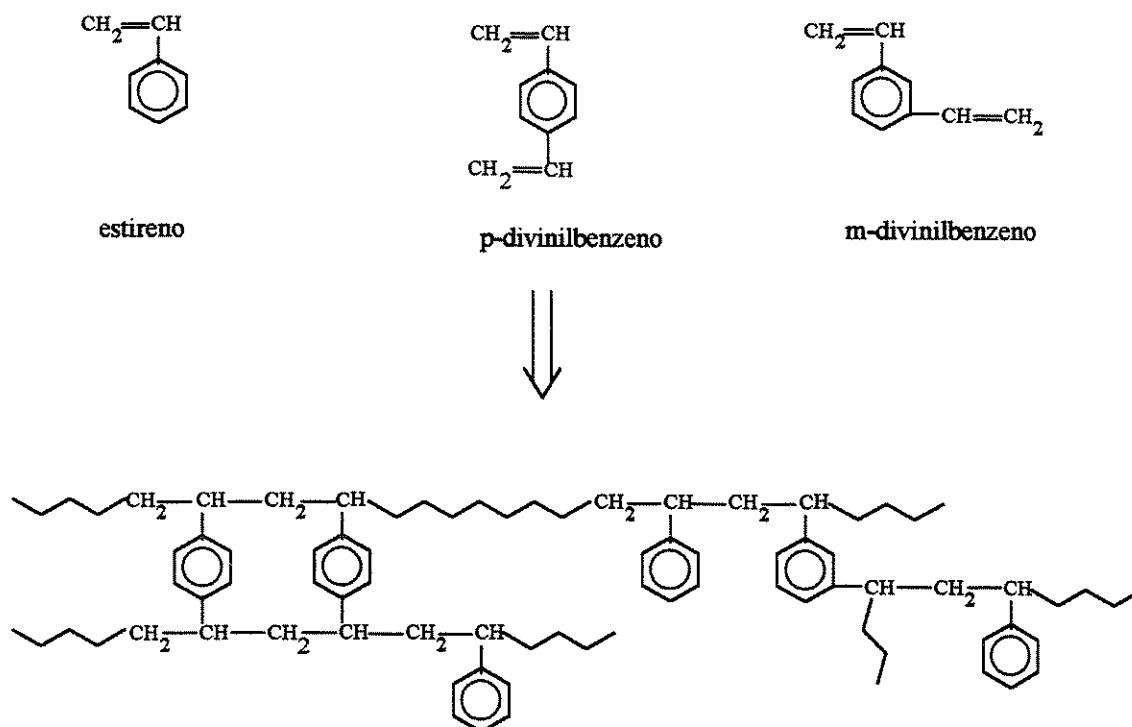


FIGURA 2.7- Mecanismo de formação de copolímeros de estireno e divinilbenzeno (GLÖCKNER, 1987).

2.6- Síntese de Bioésteres Catalisadas por Lipases

A versatilidade da lipase como catalisador para obtenção de ésteres é evidente pelo número de processos em fase de implantação industrial (BALCÃO *et al.*, 1996). Por exemplo, a esterificação por lipase foi recentemente comercializada pela Unichema International para produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilhexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização

em bateladas subseqüentes (NOVO NORDISK, 1995).

Os ésteres de glicerol apresentam também relevantes propriedades como agentes emulsificantes e, dependendo de sua composição, podem fazer parte de sistemas emulsificantes para uso em cremes, molhos e loções (HARWOOD, 1989).

Uma outra aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres aromatizantes, principalmente para o uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. O mercado mundial para esses compostos está avaliado em US\$ 3 bilhões, um montante que representa aproximadamente um quarto do valor do mercado de aditivos alimentares (VULFSON, 1993). Além disso, quando preparados por processos enzimáticos podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural, sendo portanto preferidos pelo mercado consumidor.

A síntese de ésteres catalisada por lipases já foi descrita para mais de 50 ésteres formadores de aromas e o processo pode ser realizado em meios reacionais contendo mistura de álcool e ácido carboxílico em presença ou ausência de solventes, resultando em altas produtividades e rendimentos praticamente quantitativos (LANGRAND *et al.*, 1988; CASTRO *et al.*, 1997a).

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas por esta técnica, a síntese de selecionados ésteres de baixo peso molecular, apresenta dificuldades técnicas em função do complexo mecanismo da ação enzimática em meios polares. Diversos parâmetros, como por exemplo hidratação da enzima, temperatura, concentração do substrato, tamanho da cadeia e estrutura química podem afetar o desempenho da síntese (LAANE *et al.*, 1987; LANGRAND *et al.*, 1990; WELSH *et al.*, 1989).

Neste trabalho, foi tratado apenas a esterificação de álcool com ácidos, embora os ésteres possam ser obtidos por interesterificação, alcoólise e acidólise. Como

modelo de estudo foi adotado a obtenção do butirato de butila, um importante éster aromatizante de grande aplicação nas indústrias alimentícias (vide TABELA 2.4) empregando a preparação de lipase imobilizada obtida neste trabalho

Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos por uma preparação de lipase imobilizada disponível comercialmente (Lipozyme) tomando por base estudos realizados anteriormente (CASTRO *et al.*, 1997b).

TABELA 2.4- Propriedades e Uso do Butirato de Butila

| <i>Propriedades</i> | <i>Butirato de butila</i> |
|--------------------------------|---|
| Outros nomes | Éster butila de ácido butanóico |
| Fórmula Empírica | $C_6H_{12}O_2$ |
| Aparência | Incolor |
| Massa Molecular | 144,21g/mol |
| Peso específico | 0,869 |
| Solubilidade | Insolúvel em H_2O ; Miscível em álcool e éter |
| Características organolépticas | Odor penetrante |
| Aplicação | Bebidas não alcoólicas, sorvetes, gelatinas, goma de mascar. |

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais

Enzima: Lipase de origem microbiana (*Candida rugosa*) adquirida comercialmente da Sigma Co, EUA, contendo lactose (*Candida rugosa* lipase, Tipo VII), com atividade específica média declarada 1440 U/ mg proteína (Biureto) e 835U/mg sólido.

Suportes: Como suportes foram testados a resina de poli-n-metilolacrilamida (PNMA) fornecida pelo Departamento de Tecnologia de Polímeros -FEQ/UNICAMP - com as seguintes características: estrutura porosa, granulometria de 80-100 mesh, não perolizada, área BET $0,91 \pm 0,08 \text{ m}^2/\text{g}$ e volume de poros $0,71 \text{ cm}^3/\text{g}$ (BALTIERI, 1996) e o copolímero de divinilbenzeno-estireno (STYDVB) desenvolvido pelo Instituto de Macromoléculas Profa. Heloisa Mano - UFRJ com as seguintes características: estrutura macroporosa, 45% DVB, granulometria 80 a 100 mesh; diâmetro médio de poro 291 \AA ; área BET $0,99 \text{ m}^2/\text{g}$; volume de poros $0,72 \text{ cm}^3/\text{g}$.

Outros Reagentes: Heptano p.a.(Labsynth), Metanol p.a. (EM Science); Acetona p.a. (Merck); Etanol comercial; Sódio Metálico (Riedel-de Hæn AG); peneira molecular $0,32 \text{ cm}$ de diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD Chemicals; Solução de Karl Fisher isenta de Piridina (Merck); goma arábica em pó, pura (Mallinckrodt); reagente de Folin-Ciocalteau (Sigma), albumina bovina (Sigma); Glicerina p.a.(Merck); Cloreto de Sódio p.a.; óleo de oliva comercial (baixa acidez), Ácido Butírico p.a.(Riedel-de Hæn AG); Butanol p.a. (Merck), Butirato de Butila (sintetizado por via química, nos laboratórios da FAENQUIL).

3.2- Equipamentos

Foram utilizados: para medida de pH - pHmetro modelo TEC2 (TECNAL), para ensaios colorimétricos - espectrofotômetro modelo B295II (Micronal); determinação do teor de água - Titulador automático de Karl Fischer modelo D18 (Mettler); os experimentos de imobilização foram realizados em agitador magnético modelo 735 (FISATON); as dosagens de atividade enzimática bem com as reações de síntese foram efetuadas em banho termostatzado com agitação, modelo 145 (FANEN); as dosagens do álcool e do éster foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo CG 37 (Instrumentos Científicos C.G. Ltda) e os teores de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio em Analisador Elementar CHN 2400 (Perkin Elmer).

3.3- Procedimento Experimental

3.3.1- Seleção do Suporte de Imobilização

Para a avaliação preliminar dos suportes foi adotado um procedimento padrão de imobilização, mantendo fixa a relação enzima:suporte em 25 mg de proteína/ grama de suporte. A massa de lipase foi dissolvida em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e misturada com a massa proporcional de cada tipo de suporte testado. A adsorção da lipase ao suporte foi realizada sob agitação durante 2 horas. A enzima imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo e o sistema imobilizado foi lavado com tampão fosfato para remoção da enzima não adsorvida no suporte. Os biocatalisadores imobilizados foram utilizados na síntese do butirato de butila sem nenhum tratamento posterior de secagem.

3.3.2- Imobilização da Lipase em STYDVB

As imobilizações da lipase foram efetuadas em Erlenmeyers de 125 ml utilizando uma proporção previamente estabelecida de 25 mg de proteína/ por grama de suporte, empregando como meios dispersantes tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e heptano, conforme esquema mostrado na FIGURA 3.1.

Em meio aquoso, a massa de enzima foi inicialmente dissolvida em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e então adicionou-se à mistura a massa proporcional de STYDVB sem nenhum pré-tratamento. Após o tempo mínimo pré-estabelecido para a adsorção da enzima no suporte (2 horas sob agitação de 100 rpm), foi efetuada a filtragem da mistura em funil de Buchner sob pressão reduzida. O filtrado (filtrado 1) foi totalmente recolhido e armazenado para análise. Em seguida foram realizadas as operações de lavagem do imobilizado com tampão fosfato pH 7,0 (3 volumes) para retirada de toda enzima não fixada no suporte, reservando em frascos diferentes cada água de lavagem para posterior análise (filtrados 2, 3, 4).

Na imobilização da lipase em meio orgânico, inicialmente o copolímero foi suspenso em heptano durante 30 minutos sob agitação de 100 rpm. Em seguida, a lipase foi adicionada na mistura sob agitação e após 2 horas de adsorção, a mistura foi filtrada em tela de nylon de 420 mesh, sob pressão reduzida em funil de Buchner, armazenando-se o filtrado para análise (sobrenadante). Após a retirada do derivado produzido, o nylon foi deixado em contato com 20 ml de tampão e este volume foi armazenado para análise (F1).

3.3.3- Procedimento Geral das Reações de Esterificação

As esterificações foram conduzidas em reatores fechados de 100 ml, contendo quantidades apropriadas de butanol e ácido butírico em heptano desidratado previamente com sódio metálico. As misturas foram incubadas com preparações das

enzimas livres ou imobilizadas, contendo ambas a mesma quantidade de atividade enzimática. Os experimentos foram realizados na temperatura de 37°C, sob agitação constante de 150 rpm, por um período mínimo de 24 horas.

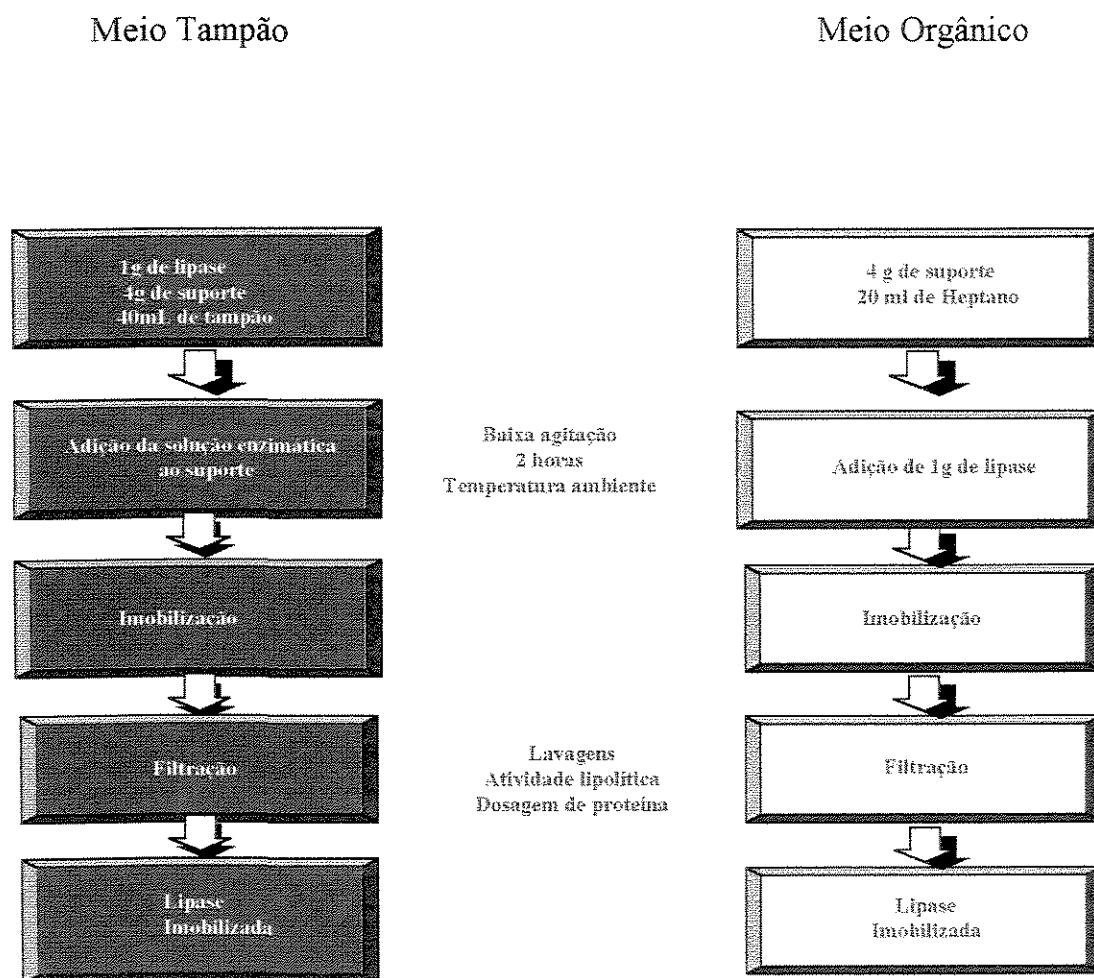


FIGURA 3.1- Metodologia para imobilização de lipase em STYDVB, empregando tampão fosfato de sódio e heptano como meios de dispersão.

3.4- Análises

3.4.1- Determinação de Proteína

O conteúdo de proteína da lipase solúvel foi determinado através do método colorimétrico de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Albumina bovina cristalina foi usada para preparar uma curva de calibração na faixa de 50 µg/ml a 300 µg/ml (Apêndice 1).

3.4.2- Determinação da Atividade Lipolítica

A atividade enzimática das lipases nas formas livre e imobilizada foram determinadas pelo método de hidrólise, conforme descrito por MUSTRANTA *et al.* (1993). O substrato foi preparado através da emulsão de 50 ml de azeite de oliva e 50 ml de agente emulsificante. A emulsão foi preparada com 17,9 g/l de NaCl, 0,41 g/l de KH_2PO_4 , 10 g/l de goma arábica, 54% de glicerina e água destilada para completar o volume. Em frascos de Erlenmeyer de 125 ml foram adicionados: 5 ml de substrato, 4 ml de solução tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 ml da solução enzimática (5mg/ml) ou cerca de 200 mg de lipase imobilizada. Os frascos foram incubados a 37°C por 10 e 30 minutos, respectivamente, em banho termostatizado com agitação e após este tempo a reação foi paralisada pela adição de 15ml de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,04M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados através da equação 3.1 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Para cada análise de atividade, foi realizado um controle utilizando água destilada ou 200 mg do suporte.

$$\text{Atividade } (\mu\text{moles/g} \cdot \text{min}) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times D \times 10^6}{t \times m} \quad \text{Eq. (3.1)}$$

onde: V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra; V_b = volume do KOH gasto na titulação do branco; M = molaridade da solução de KOH; D = diluição da amostra; t = tempo de reação em min; m = massa em gramas.

3.4.3- Teor de Ácido Graxo

A concentração de ácido butírico foi determinada por titulação de alíquotas diluídas em etanol, empregando-se solução alcoólica de KOH 0,02N e fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram efetuados através da equação 3.2.

$$\% \text{ Ácido Graxo} = \frac{V \times N \times M}{10 \times W} \quad \text{Eq. (3.2)}$$

onde: V = volume gasto de KOH; N = normalidade da solução de KOH; M = massa molecular do ácido graxo titulado; W = massa da alíquota titulada.

3.4.4- Teor de Água

Os teores de água nas fases líquida e sólida foram medidos diretamente em um titulador automático Karl Fischer.

3.4.5- Teor de Álcool e Éster

As concentrações de butanol e butirato de butila foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP), operando numa temperatura de 60°C e empregando-se hexanol como padrão interno. No Apêndice 2 são apresentados os parâmetros

operacionais empregados bem como cromatogramas típicos das análises efetuadas.

3.4.6- Coeficientes de Partição

Os coeficientes de partição do butanol e ácido butírico (Apêndice 3) foram estimados através da equação 3.3 (FUKUI *et al.*, 1987):

$$P = \frac{C_0 - C}{C} \times \frac{V_0}{V - V_0} \quad \text{Eq. (3.3)}$$

onde: P = coeficiente de partição; C_0 = concentração inicial do reagente na fase líquida; C = concentração final de reagente na fase líquida; V_0 = volume da fase líquida; V = volume da fase líquida + volume da fase sólida.

Para estimativa do volume do suporte ($V - V_0$), foi determinado a densidade do suporte através de uma curva de calibração (massa X volume), sendo encontrado o valor da densidade do STYDVB igual a 0,42 g/ cm³ (Apêndice 3). Neste teste foi empregado uma massa de 0,26 g de suporte ocupando um volume de 0,61 ml (volume da fase sólida), a qual foi deixada em contato com 5 ml de soluções puras de cada composto em heptano por um período de 2 horas. As concentrações iniciais e finais de butanol e do ácido butírico foram determinadas através das metodologias descritas anteriormente (itens 3.4.3. e 3.4.5).

3.5- Avaliação do Procedimento de Imobilização

3.5.1- Massa Seca

As lipases imobilizadas foram pesadas em placas de Petri previamente taradas para verificação da massa úmida de imobilizado e em seguida a umidade das amostras

foi dosada diretamente pelo titulador automático de Karl Fisher.

3.5.2- Recuperação de Proteína (RP %)

A quantidade de proteína fixada foi determinada conforme procedimento descrito no item 3.4.1 e os cálculos foram realizados pela eq. 3.4.

$$RP (\%) = \frac{P_{ads}}{P_0} \times 100 \quad \text{Eq. (3.4)}$$

onde: P_0 = proteína oferecida para imobilização; P_{ads} = proteína determinada como a diferença entre P_0 e as proteínas remanescentes no sobrenadante e filtrados ao final da adsorção.

3.5.3- Rendimento de Imobilização (RI%)

O rendimento de imobilização foi calculado pela equação 3.5.

$$RI(\%) = \frac{U_{ads}}{U_0} \times 100 \quad \text{Eq. (3.5)}$$

onde: U_{ads} = unidades de atividade enzimática medidas no suporte (Atividade x Massa seca)

U_0 = unidades de atividade oferecidas para imobilização

O rendimento de imobilização foi também avaliado através do balanço de massa do suporte, lipase livre e lipase imobilizada por dosagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio determinadas diretamente pelo Analisador Elementar.

3.6- Propriedades Catalíticas da Lipase Livre e Imobilizada

3.6.1- Influência do pH

As atividades das lipases livre e imobilizada foram estudadas utilizando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva na faixa de pH entre 7,0 e 9,0, com incremento de 0,5. Para este estudo foi empregada a mesma metodologia descrita no item 3.4.2 variando o pH do tampão fosfato de sódio utilizado.

3.6.2- Influência da Temperatura

Foi verificada a influência da temperatura nas atividades das lipases livre e imobilizada empregando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme descrito no item 3.4.2, nas temperaturas de 37°C, 40°C, 50°C e 60°C.

3.6.3- Estabilidade Térmica

Para determinação da estabilidade térmica, ambas as preparações de lipase, solúvel e imobilizada em STYDVB, foram utilizadas na reação de hidrólise do azeite de oliva nas temperaturas de 40, 50 e 60°C conforme procedimento descrito no item 3.4.2.

3.6.4- Influência do Tempo de Estocagem na Atividade da Enzima Imobilizada

A lipase imobilizada foi mantida na temperatura de 4°C por cerca de 6 meses. A cada mês a atividade do mesmo foi dosada, empregando-se a hidrólise do azeite de oliva, conforme descrito no item 3.4.2.

3.7- Desempenho da Lipase Imobilizada em STYDVB na Síntese de Ésteres

Foram estudadas as seguintes variáveis de controle: razão molar de reagentes e massa de lipase imobilizada. A conversão molar em todas as reações foi calculada com base no consumo de butanol, conforme equação 3.6.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad \text{Eq. (3.6)}$$

onde: C_0 = concentração inicial do reagente em mol/ l e C = concentração final do reagente em mol/ l no tempo determinado.

3.7.1- Influência da Razão Molar

No estudo da melhor proporção molar de reagentes para a síntese do éster foram utilizados substratos com razões molares entre 0,53 a 2,8. Os substratos foram preparados conforme descrito anteriormente (item 3.3.3) e as reações foram efetuadas conforme descrito anteriormente (item 3.3.3) numa temperatura de 37°C e agitação de 150 rpm.

3.7.2- Influência da Massa de Lipase Imobilizada

Para determinar a quantidade mínima de enzima imobilizada necessária para alcançar rendimentos satisfatórios na reação de esterificação foram utilizadas diferentes massas do derivado imobilizado, empregando-se concentrações fixas de ácido butírico em 0,60 M e butanol em 0,40 M (razão molar de 1,5). Tomando-se por base a massa total de reagentes em 20 mL de substrato, foram calculadas as seguintes porcentagens da massa total de reagentes: 1% (16 mg do derivado imobilizado); 5% (80 mg do derivado imobilizado); 10% (160 mg do derivado imobilizado); 15% (250 mg do

derivado imobilizado); 25% (410 mg do derivado imobilizado); 60% (1000 mg do derivado imobilizado). Todas as reações foram conduzidas a 37°C, por um período de 24h e monitoradas no tempo zero e no tempo final, conforme descrito no itens 3.4.3 e 3.4.5.

3.7.3- Estabilidade Operacional

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi verificada em reações de esterificação em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado, de acordo com metodologia descrita anteriormente (CASTRO *et al*, 1996). A estabilidade da lipase imobilizada frente a bateladas consecutivas foi realizada utilizando-se 1,0 grama de lipase imobilizada e 20 ml de substrato contendo 0,56M de ácido butírico e 0,36M de butanol. Neste estudo empregou-se, em todas as bateladas, a mesma massa de biocatalisador suportado, acondicionada em um invólucro de nylon de 420 mesh. Foram realizadas 12 bateladas de 24 horas cada uma, numa temperatura de 37°C, monitoradas nos tempos iguais a zero e 24h conforme itens 3.4.3 e 3.4.5. Entre as bateladas, a lipase imobilizada foi lavada com o solvente utilizado no substrato (heptano) para remoção dos reagentes e/ou produtos eventualmente retidos no suporte. Após uma hora, tempo necessário para evaporação do solvente, a lipase imobilizada era reutilizada em uma outra reação com um novo substrato nas mesmas concentrações do utilizado na reação anterior.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Seleção do Suporte

Neste trabalho foi adotado como critério para seleção preliminar do suporte de imobilização a sua afinidade pela água, sendo testados inicialmente dois suportes de natureza polimérica: PNMA (polimetilolacrilamida) e STYDVB (copolímero de divinilbenzeno e estireno), conforme metodologia descrita no item 3.3.1.

A TABELA 4.1 apresenta as porcentagens de recuperação de proteína (RP %) e rendimento de imobilização (RI %) para os dois suportes testados. Apesar da similaridade entre os valores de recuperação de proteína para ambos os suportes (32 %), rendimentos de imobilização mais elevados foram obtidos quando a lipase foi imobilizada no copolímero STYDVB (15%). Resultados similares foram alcançados por BALTIERI (1996), empregando a resina PNMA e lipase pancreática de porco em tampão fosfato pH 7,0. Esta baixa eficiência de imobilização da lipase em resina PNMA pode estar associada a uma forte interação da enzima ao suporte, limitando o acesso do substrato (triglicerídeo ou água) necessário para promover a reação de hidrólise, ou também associada ao tamanho de poro do suporte que não comporta a enzima e substrato numa conformação ideal.

Segundo YUNUS *et al.* (1996) a expressão de atividade de um derivado imobilizado de lipase é extremamente dependente das propriedades da superfície do suporte, isto é, a lipase imobilizada somente será ativa se ocorrer um fácil contato entre o derivado e o substrato. Além disso, nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que melhores atividades foram obtidas quando o suporte continha uma pequena quantidade de DVB (da ordem de 5%).

Para verificar a possibilidade da resistência à transferência de massa para o transporte de moléculas de óleo no derivado imobilizado em PNMA, determinou-se a atividade de esterificação para ambas as preparações de lipase imobilizada na reação

do butanol com ácido butírico.

As sínteses foram conduzidas empregando massas dos derivados imobilizados contendo em média 2930 unidades de atividade. Os resultados obtidos foram comparados com o comportamento da lipase livre e expressos em termos de atividade específica (mM Butanol consumido/ grama de lipase imobilizada/ tempo de reação em hora).

De acordo com a FIGURA 4.1 (Apêndice 6), a resina PNMA apresenta limitações para ser usada como matriz para imobilização de lipase, tanto para aplicação nas reações de hidrólise como para as reações de síntese.

Consequentemente, os trabalhos subsequentes foram direcionados para determinar a eficiência do suporte STYDVB como matriz para imobilização da lipase de *Candida rugosa*. Além disso, os resultados satisfatórios publicados por RUCKENSTEIN e WANG (1993), empregando estireno com diferentes teores de divinilbenzeno, reforçaram esta seleção.

TABELA 4.1- Valores médios da eficiência de imobilização da lipase de *Candida rugosa* nos dois tipos de resina testadas empregando tampão fosfato como meio dispersante.

| <i>Suporte</i> | <i>Recuperação de Proteína</i> (%) | <i>Rendimento de Imobilização</i> (%) |
|-----------------------|---------------------------------------|--|
| PNMA ⁽¹⁾ | 32,92 | 1,90 |
| STYDVB ⁽²⁾ | 32,55 | 15,24 |

⁽¹⁾ Apêndice 4

⁽²⁾ Apêndice 5

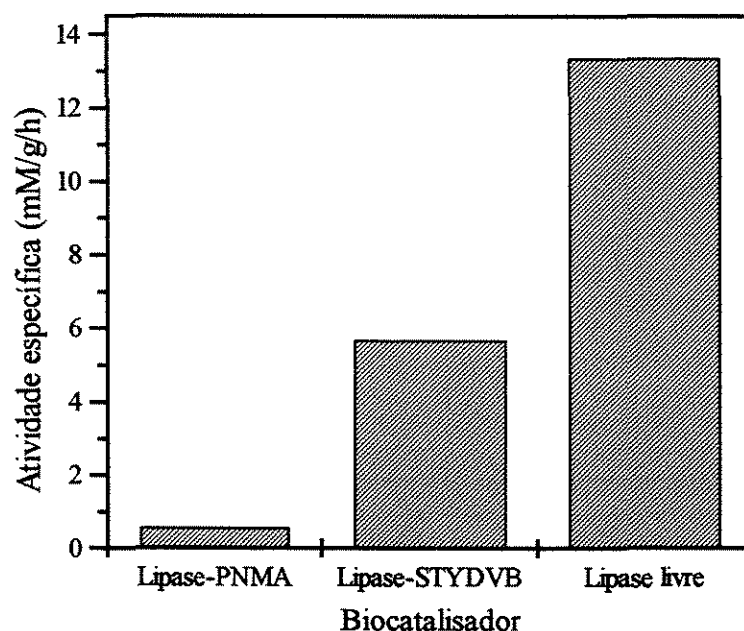


FIGURA 4.1- Influência do suporte na taxa de esterificação a 37° C do butanol e ácido butírico alcançada por preparações de lipase imobilizada em PNMA e STYDVB, empregando tampão fosfato de sódio como meio dispersante de imobilização. As reações foram conduzidas em reatores fechados contendo 20 ml de substrato constituído de ácido butírico (398 mM) e butanol (162 mM) catalisadas por 0,80 gramas de lipase-PNMA base seca (3,69 U/ mg seca), 0,30 gramas lipase-STYDVB base seca (9,4 U/ mg seca) e 50 mg de Lipase livre (36,2 U/mg lipase)

4.2- Imobilização da Lipase no Suporte Selecionado

A TABELA 4.2 (Apêndices 5 e 7) fornece os resultados para imobilização de lipase em STYDVB, conforme metodologia descrita em 3.3.2. Dois tipos de meios dispersantes foram usados para imobilização da lipase e os melhores resultados, com

relação a recuperação da atividade total depois da imobilização, foram obtidos empregando heptano como meio de dispersão.

Devido à natureza hidrofóbica do suporte, no procedimento empregando meio aquoso como agente dispersante (Tampão Fosfato de Sódio pH 7,0) não foi observado uma mistura homogênea no sistema solução enzimática/ suporte. Neste caso, o contato entre a lipase e a resina só aconteceu na interface das duas fases da mistura heterogênea e este fato influenciou tanto na recuperação de proteína como no rendimento de imobilização.

Por outro lado, no procedimento de imobilização efetuado em meio heptano foi observado uma dispersão homogênea durante agitação, provavelmente devido à compatibilidade do suporte com a enzima com o solvente, garantindo desta forma uma melhoria considerável no rendimento de imobilização, sendo obtido uma recuperação de proteína ($> 80\%$) e rendimentos de imobilização superiores a 40%. Este fato confirma as informações disponíveis na literatura relativas à hidrofobicidade da lipase comercial (RUA *et al.*, 1993) e de sua maior atividade quando imobilizada em suportes hidrofóbicos dispersos em meio orgânico e não polar (MUSTRANTA *et al.*, 1993).

Através da análise elementar dos materiais envolvidos na imobilização da lipase em STYDVB, foi também possível comparar a eficiência dos procedimentos adotados empregando tampão fosfato e heptano como meios dispersantes. Os dados mostrados na TABELAS 4.3 confirmaram que os rendimentos mais elevados de imobilização da lipase em STYDVB foram obtidos quando a adsorção foi efetuada em meio heptano.

Os resultados indicam também que a preparação de lipase imobilizada obtida em meio heptano é superior à correspondente preparação obtida em meio aquoso, não somente com relação ao rendimento de imobilização como também com relação à estabilidade operacional do derivado imobilizado.

Como mostrado na FIGURA 4.2 (Apêndice 8), a estabilidade operacional do sistema imobilizado preparado em meio aquoso não foi satisfatória, sendo observado uma perda significativa do seu poder catalítico no primeiro reciclo efetuado. Por outro

lado, o derivado imobilizado preparado em heptano mostrou-se estável mantendo sua atividade original por mais de seis bateladas consecutivas. Em função desse satisfatório desempenho em bateladas consecutivas, a lipase imobilizada em meio heptano foi caracterizada e aplicada na síntese do butirato de butila.

TABELA 4.2- Imobilização da lipase em STYDVB empregando diferente meios de dispersão.

| <i>Meio de Dispersão</i> | <i>Recuperação de Proteína</i> (%)* | <i>Rendimento de Imobilização</i> (%)* |
|--------------------------|--|---|
| Tampão ⁽¹⁾ | 32,55 | 15,24 |
| Heptano ⁽²⁾ | 92,00 | 46,00 |

⁽¹⁾ Apêndice 5

⁽²⁾ Apêndice 7

* Valores médios.

TABELA 4.3- Balanço de massa da lipase imobilizada em STYDVB

| <i>Material</i> | <i>Carbono</i> (%) | <i>Hidrogênio</i> (%) | <i>Nitrogênio</i> (%) |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Suporte (STYDVB) | 91,30 | 8,12 | 2,21 |
| Lipase livre | 25,04 | 4,88 | 2,64 |
| Composição teórica* | 78,04 | 7,47 | 2,31 |
| STYDVB-Lipase (Tampão) | 78,68 | 7,59 | 1,45** |
| STYDVB –Lipase (Heptano) | 77,13 | 7,50 | 2,39 |

* Composição teórica baseada na razão enzima suporte empregada (0,25 gramas de lipase/ grama de suporte, conforme descrito no Apêndice 9).

** Erro de análise.

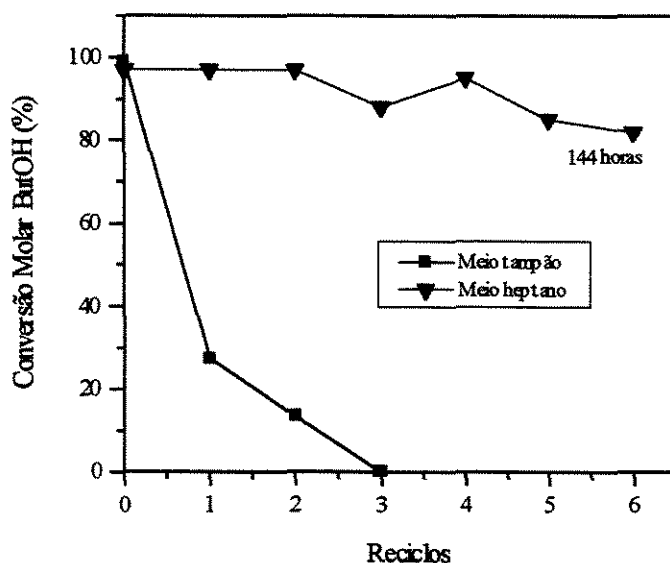


FIGURA 4.2- Comparação da estabilidade operacional da lipase imobilizada em STY-DVB em reações de esterificação consecutivas do ácido butírico com butanol na razão molar de 1,5:1,0 a 37°C catalisadas por 0,5 grama do derivado obtido em tampão (27,14 U/ mg e 33% de umidade) 0,5 grama do derivado obtido em heptano (113,47 U/ mg e 7,5% de umidade), em 20 ml de substrato.

4.3- Provável Mecanismo de Retenção de Lipase em STYDVB empregando Heptano como Meio dispersante.

Além da hidrofobicidade do suporte, o aumento na estabilidade do sistema imobilizado em STYDVB preparado em heptano pode ser resultado da melhor retenção de enzima na superfície do suporte em solvente apolar. Não está claro se o suporte pode ser “expandido” em heptano, promovendo uma melhor distribuição da enzima na superfície do suporte ou se a polaridade do solvente auxilia na conservação da camada protetora de água ao redor da enzima.

Apesar de ambos mecanismos assegurarem uma elevada retenção de atividade

no suporte, é mais provável que solventes com baixa polaridade (alto valor de log P) tenha permitido manter as propriedades da configuração da enzima. Este fato não é surpreendente, visto que solventes hidrofóbicos, como os alcanos ($\text{Log P} > 3,5$) retêm a atividade original da enzima (LAANE *et al.*, 1987¹).

Resultados similares têm sido descritos por diversos pesquisadores, indicando uma nova tendência na utilização de solventes orgânicos apolares como meio de dispersão para imobilização de lipases (MUSTRANTA *et al.*, 1993; FUKUNAGA *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 1998). Esta metodologia pode também ser considerada como uma variante do procedimento de imobilização, conhecido como micelas reversas e amplamente aplicado para imobilização de lipases (JESUS *et al.*, 1997).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a lipase esteja depositada sobre a superfície porosa do suporte de STYDVB e que possíveis interações químicas devem ocorrer entre os elétrons do nitrogênio terminal da cadeia de aminoácidos e a carga positiva do anel aromático provocada pela ressonância no mesmo (FIGURA 4.3).

4.4- Propriedades Catalíticas da Lipase Livre e Imobilizada em STYDVB

O procedimento de imobilização pode acarretar em mudanças nas propriedades físico-químicas e na cinética da enzima. Para verificar as alterações causadas nas propriedades originais da lipase livre, neste grupo de experimentos foi avaliada a influência do pH e temperatura na atividade enzimática das lipases livre e imobilizada bem como estimado a estabilidade térmica e estabilidade ao estoque.

A lipase imobilizada em STYDVB mostrou-se ativa na reação de hidrólise do azeite de oliva, na faixa de pH entre 7,0 e 9,0 (FIGURA 4.4 - Apêndice 10), tendo sido

¹Lop P calculado com base na concentração dos solventes em um sistema octanol/água.

constatado um pequeno decréscimo no valor do pH ótimo da lipase imobilizada (pH 7,5) em relação a lipase livre (pH 8,0).

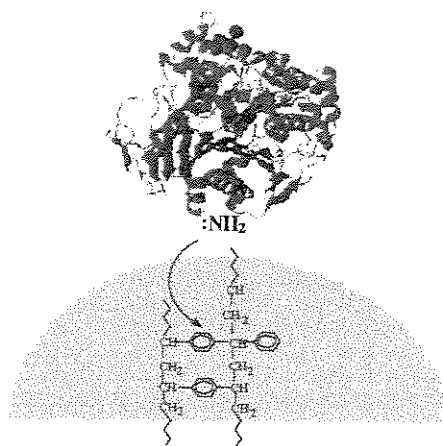


FIGURA 4.3- Provável mecanismo de adsorção da lipase de *Candida rugosa* em STYDVB empregando heptano como meio de dispersão

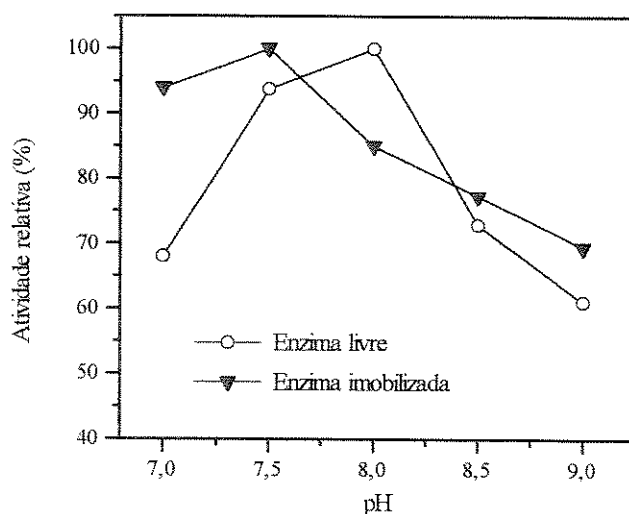


FIGURA 4.4- Estudo da influência do pH nas atividades das lipases livre e imobilizada em STYDVB quando aplicadas na hidrólise do azeite de oliva, na faixa de pH entre 6,0 a 9,0 na temperatura de 37°C tomando como parâmetro referencial de 100% as atividades de 1500U/mg para a lipase livre e 121,23U/mg para a lipase imobilizada.

Os resultados mostrados na FIGURA 4.5 (Apêndice 10), indicam que a temperatura ótima para a lipase livre foi em torno de 40°C enquanto que para a lipase imobilizada foi em torno de 50° C. Esses resultados sugerem que a imobilização melhora a estabilidade da lipase. Este fato foi verificado através da determinação das atividades residuais para as lipases livre e imobilizada após incubação numa faixa de temperatura entre 40-60° C em pH 7,0 (solução de fosfato de sódio 0,1M) por um período de 1 hora (FIGURA 4.6 - Apêndice 11). Os perfis das curvas indicam que em presença de tampão, a lipase imobilizada em STYDVB apresentou uma menor taxa de desativação térmica. Na temperatura de 60°C, a enzima ainda reteve aproximadamente 50% de sua atividade inicial. Nas mesmas condições, a lipase livre já apresentou desnaturação, isto é, perda de 94% da atividade inicial. A enzima imobilizada, por sua vez, praticamente não apresentou desativação térmica após 60 minutos nas temperaturas entre 40 e 50°C, enquanto a enzima livre, já na temperatura de 40°C, começou a mostrar desnaturação térmica, sendo que a 50°C só apresentou 11% de sua atividade inicial após 60 minutos de incubação.

Para verificar a estabilidade térmica da lipase-STYDVB por um período mais longo de incubação nas diversas temperaturas foi dobrado este tempo para 120 minutos (FIGURA 4.7- Apêndice 11). Da análise desses resultados recomenda-se o uso do derivado em temperaturas iguais ou inferiores a 40°C.

Restrições semelhantes relativas à dependência do tempo na inativação térmica da lipase *Candida rugosa* são também encontrados na literatura. O trabalho de BATTISTEL *et al.* (1995) é bem ilustrativo com relação ao mecanismo complexo que envolve a inativação térmica das lipases de *Candidas*, mesmo em presença de poliálcoois, conhecidos como bons estabilizantes de enzimas e de outras lipases.

Nesse grupo de experimentos foi ainda verificado que nas condições de estocagem testadas e durante um período de 6 meses a lipase imobilizada perdeu cerca de 2% de sua atividade inicial, conforme mostra a FIGURA 4.8 (Apêndice 12). As características gerais da preparação de lipase imobilizada em STYDVB são

apresentadas na TABELA 4.4.

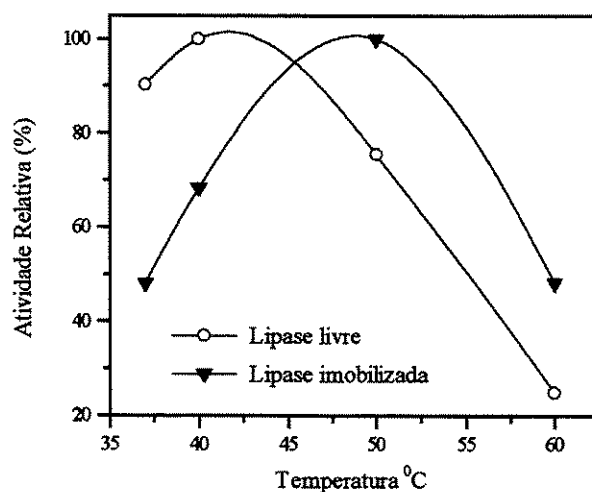


FIGURA 4.5- Estudo da influência da temperatura nas atividades das lipases livre e imobilizada em STYDVB quando aplicadas na hidrólise do azeite de oliva na faixa de temperatura entre 37 a 60°C tomando como parâmetro referencial de 100% as atividades de 2400U/mg para a lipase livre e 235,98U/mg para a lipase imobilizada..

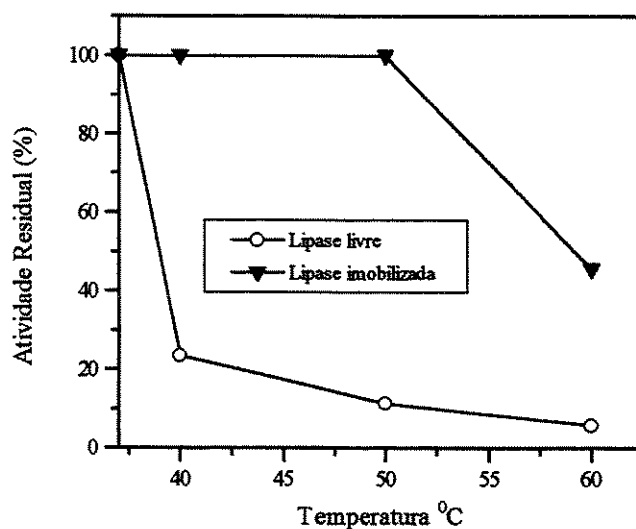


FIGURA 4.6- Comparação da estabilidade térmica das lipases livre e imobilizada após 1 hora de incubação nas temperaturas de 40 a 60°C e aplicadas na hidrólise na temperatura de 37°C, tomando como parâmetro referencial de 100%, as atividades de 1002,5 U/ mg para a lipase livre e de 113,47 U/ mg para o derivado imobilizado.

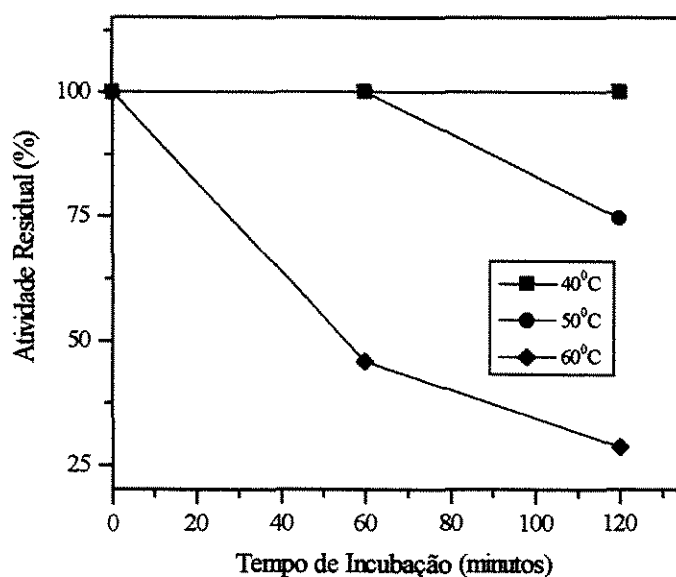


FIGURA 4.7- Estudo da estabilidade térmica da lipase imobilizada em STYDVB quando incubada nas temperaturas de 40, 50 e 60°C por 1 e 2 horas e aplicadas na reação de hidrólise do azeite de oliva na temperatura de 37°C, tomando a atividade de 113,47 U/ mg como 100% ativa.

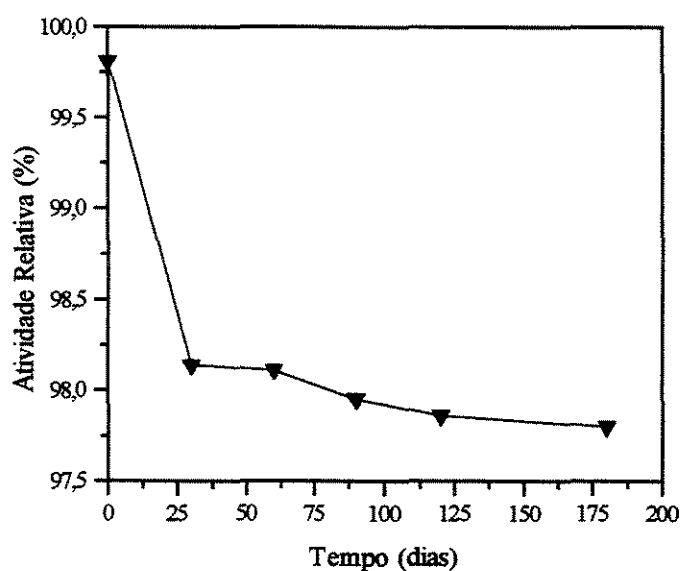


FIGURA 4.8- Verificação da estabilidade do derivado imobilizado em STYDVB em função do tempo de estocagem a 4°C. A atividade inicial de 99,81 U/ mg foi tomada como referencial de 100% ativa.

TABELA 4.4- Características da lipase imobilizada em STYDVB

| | |
|---|---|
| Tipo de Suporte | Copolímero de estireno e divinilbenzeno |
| Método de imobilização | Adsorção física |
| Meio de dispersão | Heptano |
| Rendimento de fixação de atividade lipolítica (%) | 42 |
| Atividade da enzima imobilizada (U/mg base seca) | 99-113 |
| Teor de água (%) | 5-10 |
| PH | 7,5 |
| Temperatura (°C) | 50 |
| Estabilidade operacional (esterificação) | Ativa por mais de 10 bateladas consecutivas |

As microfotografias apresentadas nas FIGURAS 4.9a a 4.9d, ilustram que no procedimento de imobilização da lipase na matriz de STYDVB ocorre um depósito da enzima sobre o suporte.

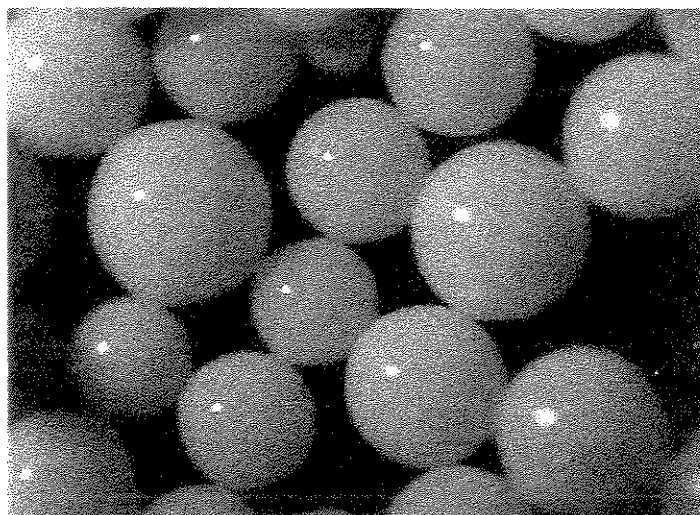


FIGURA 4.9a- Esferas do copolímero de estireno-divinilbenzeno com aumento de 50 vezes

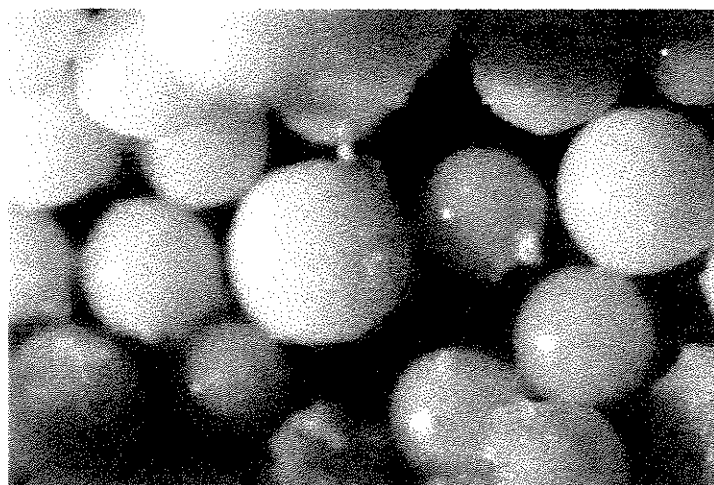


FIGURA 4.9b- Esferas do copolímero de estireno-divinilbenzeno com lipase adsorvida, com aumento de 50 vezes.

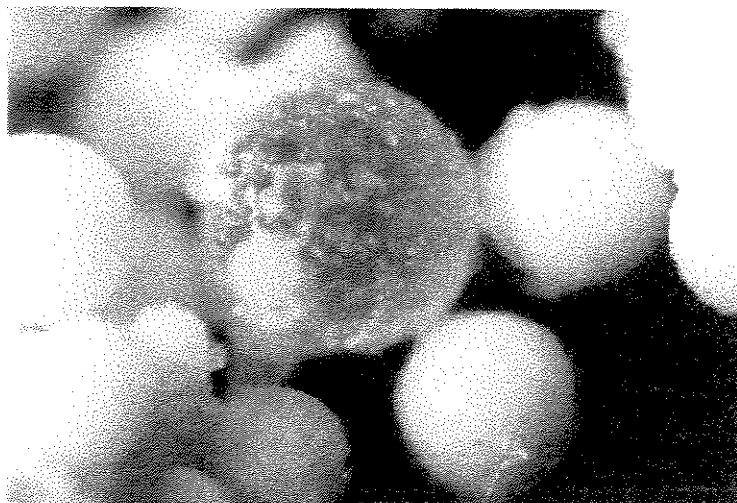


FIGURA 4.9c-Esferas do copolímero de estireno-divinilbenzeno com lipase adsorvida com aumento de 50 vezes.

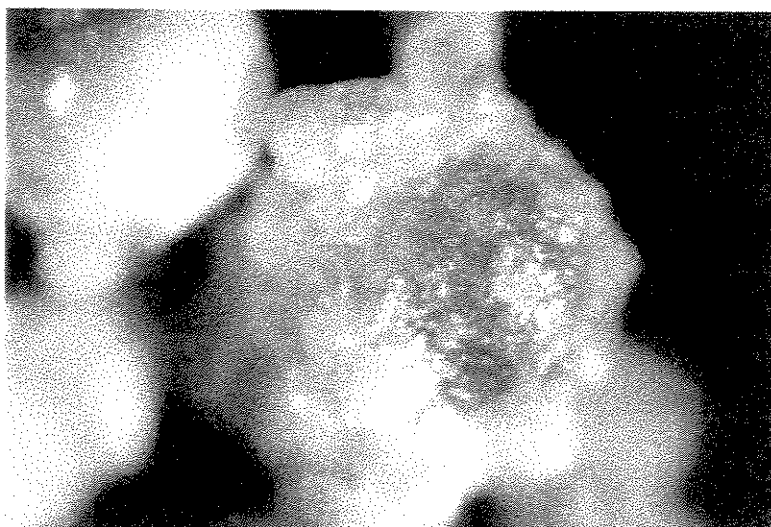


FIGURA 4.9d- Esferas do copolímero de estireno-divinilbenzeno com lipase adsorvida com aumento de 50 vezes.

4.5- Aplicação do Sistema Imobilizado na Síntese do Butirato de Butila

A síntese orgânica catalisada por enzimas envolve um mecanismo complexo dependente do tipo de substrato, enzima, solvente orgânico e concentração do meio reacional.

Para verificar a potencialidade da preparação de lipase imobilizada obtida neste trabalho, foi utilizado um sistema constituído de butanol, ácido butírico e solvente. O solvente heptano foi selecionado por apresentar total biocompatibilidade com a resina e com a lipase. Foram determinadas a influência da razão molar entre ácido e álcool e da massa de lipase imobilizada no rendimento de formação do butirato de butila.

Os dados obtidos foram comparados com aqueles obtidos em estudos anteriores, empregando uma preparação comercial de lipase imobilizada (Lipozyme) cujas propriedades catalíticas, como alta atividade e estabilidade em temperaturas de até 60°C tornaram-na uma das mais bem testadas em escala de laboratório (CASTRO e ANDERSON, 1995; CASTRO *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 1997a). Lipozyme é fornecida ao mercado consumidor com um teor de umidade de 10,0%. O suporte utilizado permite que sejam efetuadas alterações no estado de hidratação da enzima, ou por secagem ou por adição de água. Deve ser ainda destacado que qualquer alteração no estado original de hidratação da Lipozyme (10% de umidade), leva a uma redução significativa de sua atividade.

4.5.1- Influência da Razão Molar

Na síntese química de ésteres, geralmente é empregado excesso de ácido. Esta metodologia pode também ser aplicada na catálise enzimática das reações de esterificação. Entretanto, ácidos graxos de cadeia curta podem impor algum tipo de inibição no desempenho da lipase. Para verificar o efeito do ácido butírico no desempenho da lipase imobilizada em STYDVB, foram testadas relação molares

entre ácido butírico (AB) e butanol (ButOH) na faixa de 0,5 a 2,8. Como pode ser observado na FIGURA 4.10 (Apêndice 13), quando excesso de ácido butírico foi usado nenhum efeito inibidor foi detectado na atividade enzimática. De fato, o progresso da esterificação foi limitado pela disponibilidade de ácido butírico no meio reacional.

Na menor razão molar testada (AB:ButOH de 0,5) foi alcançado um valor máximo de conversão molar de butanol da ordem de 24,40%. Esta conversão foi gradualmente incrementada com os aumentos proporcionais de ácido butírico no meio reacional. Razões molares iguais ou superiores a 1,5 forneceram conversões superiores a 95%. Para quantidades próximas da equimolaridade entre os reagentes, o rendimento foi a metade daquele quando foi empregado ácido em excesso.

Esta proporção entre os reagentes é similar à encontrada com o uso de lipase imobilizada comercialmente (Lipozyme) empregando o mesmo sistema reacional (CASTRO *et al.*, 1997b). A razão para este fato pode estar relacionada com a similaridade entre os coeficientes de partição obtidos por ambas preparações de lipase imobilizada (STYDVB -Lipase e Lipozyme), como mostrado na TABELA 4.5.

Conforme mencionado anteriormente, o coeficiente de partição mede a taxa de migração dos reagentes para a fase sólida do meio reacional. Os valores indicados na TABELA 4.5 mostram que ambas preparações possuem valores de coeficiente de partição para o butanol mais elevados que os coeficientes de partição do ácido butírico, favorecendo desta maneira a migração do butanol para fase sólida da enzima. Estes resultados sugerem que as matrizes das preparações enzimáticas possuem uma maior afinidade pelo butanol que pelo ácido butírico. Sendo assim, nas interfaces entre as lipases imobilizadas e o meio reacional deve haver maior quantidade de moléculas de álcool que ácido, levando à necessidade de que o meio contenha um excesso do ácido para que seja alcançado quantidades equimolares entre os reagentes, propiciando um rendimento satisfatório na esterificação. Além disso, o excesso de ácido garante a formação do complexo enzima-grupo acil para posterior reação com o álcool, conduzindo assim, à formação do éster e reduzindo, desta forma, a competição entre os

aceptores, parâmetro essencial para a cinética de uma reação de esterificação (LANGRAND *et al.*, 1988). Isto sugere que a síntese de butirato de butila catalisada tanto pela Lipozyme ou STYDVB-Lipase pode ser limitada pela concentração de ácido butírico, induzindo à necessidade de se trabalhar com excesso deste reagente.

É interessante destacar que a atividade enzimática está diretamente relacionada com os coeficientes do substrato e produto, de tal forma que esses valores podem ser usados como parâmetros para formulação do meio reacional. Esta metodologia tem sido aplicada com sucesso para estimar as razões molares para síntese do butirato de butila empregando lipase imobilizada em Celite e em sílica de vidro de porosidade controlada (CASTRO *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 1998)

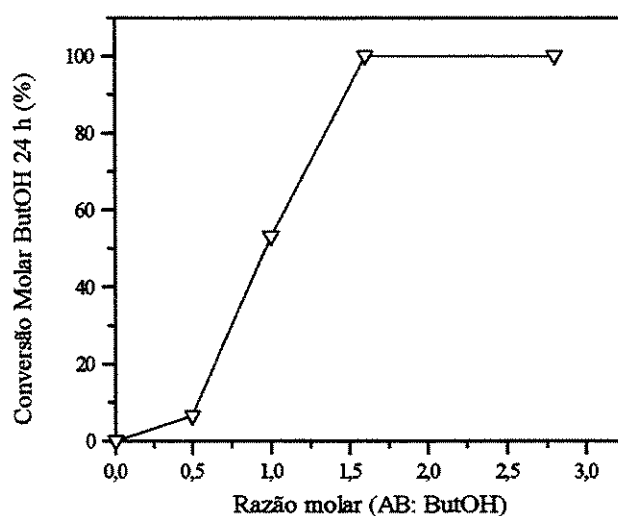


FIGURA 4.10- Influência da razão molar dos reagentes na conversão molar do butanol. As reações foram incubadas com 0,25 gramas do derivado imobilizado (113,47 U/mg) a 37°C empregando 20 ml de substratos numa concentração fixa de butanol (0,18 M) e variando as concentrações de ácido butírico entre 0,09 a 0,50 M.

TABELA 4.5- Valores médios dos coeficientes de partição do n-butanol e ácido butírico para diferentes preparações enzimáticas.

| <i>Reagente</i> | <i>Coeficiente de partição ^a</i> | |
|-----------------|---|---------------|
| | Lipozyme ^b | Lipase-STYDVB |
| n-Butanol | 2,43 | 2,32 |
| Ácido Butírico | 1,53 | 1,66 |

^aestimado de acordo com a equação 3.3 empregando soluções puras de cada composto em heptano, por 2 horas com agitação (Apêndice 3).

^bresultados descritos anteriormente (CASTRO *et al.*, 1997b).

4.5.2- Influência da Massa de Lipase Imobilizada

A conversão molar do butanol utilizando diferentes massas de lipase imobilizada em STYDVB foi avaliada através da aplicação deste derivado em substratos constituídos de ácido butírico e butanol numa razão molar de 1,5. As sínteses foram realizadas a 37°C e as massas de lipase imobilizada variaram entre 1% a 60% (80 a 1000 mg, respectivamente) da massa total dos reagentes contidos em 20 ml de substrato.

Na FIGURA 4.11 (Apêndice 14) a conversão molar do butanol é plotada em função da massa de enzima.

Valores iguais ou superiores a 15% da massa total de reagentes promovem uma conversão quase completa do butanol no período de 24 horas de reação. Essa faixa é semelhante à recomendada pelo fabricante e adotada por diversos pesquisadores nos trabalhos experimentais com Lipozyme (BALCÃO *et al.*, 1996).

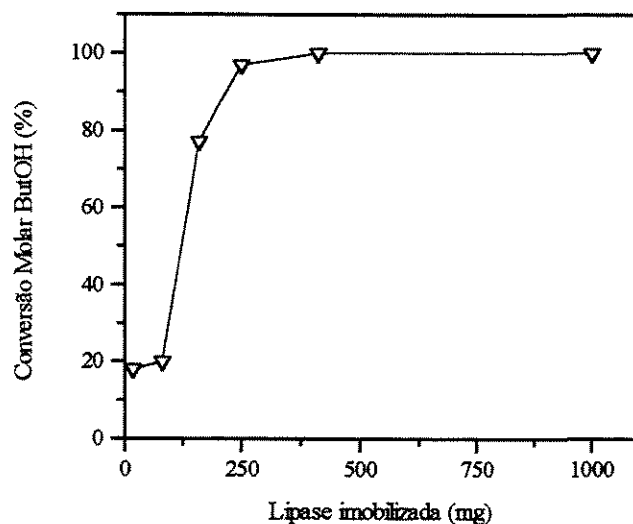


FIGURA 4.11- Estudo da influência da massa de lipase imobilizada na conversão molar de butanol a 37°C empregando 20 ml de substrato constituído de ácido butírico (0,6M) e butanol (0,4M) e as seguintes massas do derivado imobilizado (113,47 U/mg): 16mg (1,0%), 80 mg (5,0%), 160 mg (10%), 250mg (15%), 410 mg (25%) e 1000 mg (60%).

4.5.3- Comparação do Desempenho da Lipase Livre e Imobilizada na Síntese do Butirato de Butila

A finalidade deste estudo foi comparar o desempenho das lipases livre, imobilizada em STYDVB e o da Lipozyme na síntese do butirato de butila.

As sínteses foram realizadas com substratos contendo ácido butírico e butanol na proporção molar de 1,5, empregando 41000 unidades de atividade para a lipase livre, 45000 unidades de atividade para o derivado imobilizado em STYDVB e 45000 unidades de atividade para a Lipozyme, numa temperatura de 37°C.

Os resultados apresentados na FIGURA 4.12, indicam, que a taxa de conversão do butanol (expressa em mM de álcool consumido), alcançada nesta síntese pela lipase-STYDVB foi cerca de oito vezes inferior a da lipase livre e cinco vezes inferior a da Lipozyme.

Embora a Lipozyme tenha sido usada como parâmetro de comparação, esta metodologia não é totalmente adequada, tendo em vista as diferenças entre as preparações de lipase imobilizada, conforme indicado na TABELA 5.6. Além disso, o próprio fabricante (Novo Industri) relatou que tem uma limitada experiência na imobilização de Candida lipase, em função das dificuldades de se obter preparações imobilizadas com alta atividade e estabilidade (EIGTVED *et al.*, 1986).

Com relação à comparação entre a Candida lipase na sua forma livre e imobilizada em STYDVB, os resultados aparentemente indicam que a imobilização reduziu sensivelmente a atividade catalítica da enzima. Entretanto deve ser considerado que a enzima na sua forma imobilizada pode ser utilizada durante um longo período com uma pequena perda de atividade e a enzima livre após o uso é descartada. A estabilidade operacional é a seguir discutida.

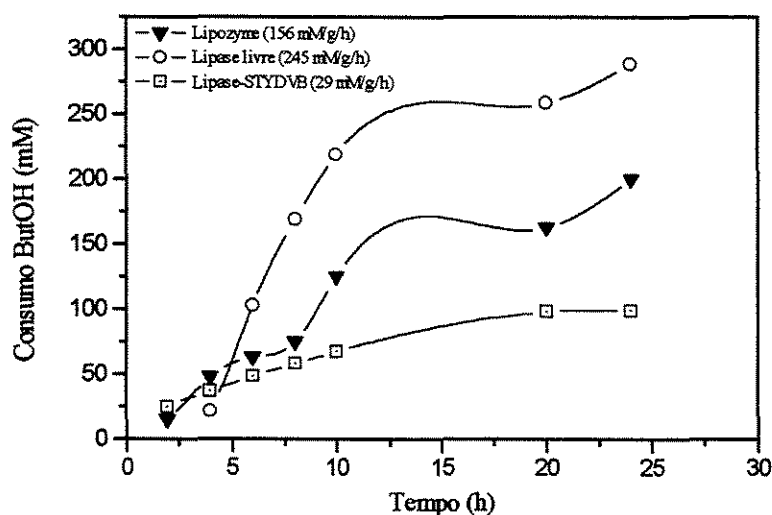


FIGURA 4.12- Comparação do desempenho da lipase livre, imobilizada em STYDVB e Lipozyme na síntese do Butirato de Butila, a 37°C, empregando 20 ml de substrato constituído de ácido butírico e butanol na razão molar de 1,5:1,0.

TABELA 4.6- Diferenças básicas entre a preparação comercial de lipase imobilizada e a obtida neste trabalho.

| <i>Características</i> | <i>Lipozyme⁽¹⁾</i> | <i>Lipase-STYDVB</i> |
|------------------------|-------------------------------|----------------------|
| Suporte | Resina aniônica | Resina hidrofóbica |
| Método de imobilização | Ligação iônica e adsorção | Adsorção |
| Fonte de enzima | Mucor miehei | Candida rugosa |

⁽¹⁾ Novo Industri, 1986

4.5.4- Estabilidade Operacional

Processos catalisados por enzimas tornam-se cada vez mais, um procedimento rotineiro em trabalhos de síntese. Para sua plena aplicação, entretanto, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados.

Além do custo, a sua disponibilidade comercial, a atividade (relação produto formado/enzima) e sobretudo a estabilidade do biocatalisador tornam-se fatores importantes sob o ponto de vista econômico.

Portanto, um dos principais objetivos de se imobilizar uma enzima é aumentar seu tempo de utilização em relação a enzima livre, procurando manter estável o par enzima-suporte num maior número possível de reações consecutivas.

O estudo da estabilidade operacional da lipase imobilizada em STYDVB foi realizado em regime de bateladas consecutivas (24h/ 37°C/ 150rpm), conforme metodologia descrita no item 3.7.3. As concentrações finais em cada ciclo dos materiais de partida (butanol e ácido butírico) e do produto formado (butirato de butila) são mostradas na FIGURA 4.13 (Apêndice 16).

No final do primeiro ciclo, a concentração molar de butirato de butila no meio reacional foi de 334 mM, o que equivale a uma conversão molar do butanol da ordem de 95%. Nas bateladas seguintes, a produção de éster alcançou teores entre 285 a 360 mM, enquanto as conversões de butanol variaram entre 94,73 a 95,12%. Essas oscilações podem ser atribuídas às pequenas variações das concentrações iniciais dos materiais de partida presentes nos substratos empregados.

De maneira geral a lipase imobilizada manteve sua atividade original por 144 horas (6 ciclos), sendo constatado após esse período, uma redução média na atividade de esterificação da ordem de 25%.

Apesar da literatura relativa à imobilização de lipases ser extensa, são poucos os

dados referentes à estabilidade operacional desses derivados. A razão para esse fato pode estar associada à baixa estabilidade operacional das lipases imobilizadas, atingindo, em alguns trabalhos, cerca de 50 a 70% de redução em menos de cinco ciclos.

Contudo, para efeito de comparação da estabilidade operacional da lipase imobilizada obtida nesse trabalho, selecionou-se resultados considerados satisfatórios pela literatura referentes à estabilidade operacional de lipases imobilizadas em suportes de natureza polimérica (TABELA 4.7), onde se observa que os dados obtidos se comparam favoravelmente com os descritos na literatura.

TABELA 4.7- Comparação da estabilidade operacional da lipase imobilizada obtida neste trabalho com dados reportados na literatura.

| <i>Suporte</i> | <i>Reação</i> | <i>Batelada⁰</i> | | <i>Referência</i> |
|-------------------------|---------------|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|
| | | <i>Inicial</i> | <i>Final</i> | |
| Polietilenimina | Síntese | 100 | 72 (10) ¹ | CAO <i>et al.</i> , 1996 |
| MA-MMA-DVB ² | Hidrólise | 100 | 40 (10) | YUNUS <i>et al.</i> , 1996 |
| Poliuretano | Síntese | 100 | 100 (20) | DIAS <i>et al.</i> , 1991 |
| ENTP ³ | Síntese | 50 | 35 (10) | FUKUNAGA <i>et al.</i> , 1996 |
| STYDVB ⁴ | Hidrólise | 99 | 90 (15) | RUCKENSTEIN e WANG, 1993 |
| STYDVB | Síntese | 95 | 75 (12) | Este trabalho |

⁰ Porcentual de atividade relativo a conversão de substrato.

¹ O número entre parênteses refere-se ao número de bateladas descritas.

² MA-MMA-DVB: copolímero de Metilacrilato/Metilmetacrilato/Divinilbenzeno.

³ ENTP Resina hidrofóbica foto reticulante (Kansai Paint, Osaka).

⁴ Copolímero de divinilbenzeno/estireno com 25% de Span 80.

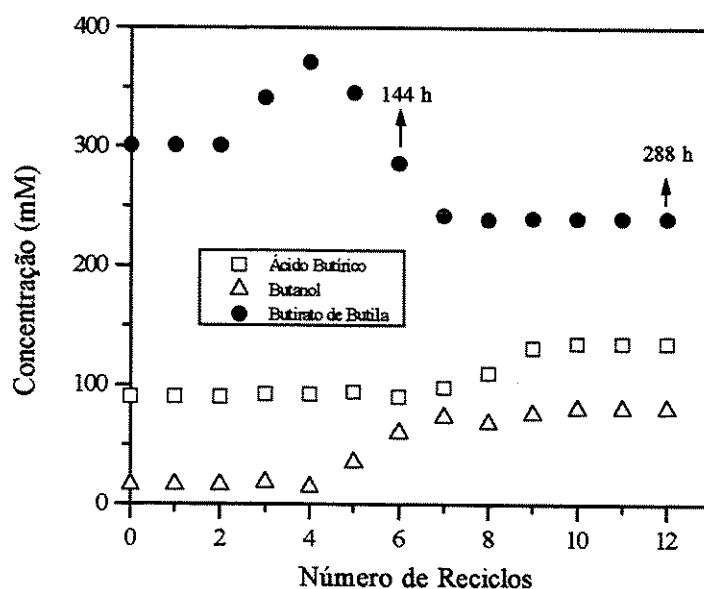


FIGURA 4.13- Estabilidade operacional da lipase imobilizada em STYDVB quando aplicada em bateladas consecutivas utilizando 20 ml de substrato (ácido butírico 0,56M e butanol 0,36M) por 24 horas numa temperatura de 37°C e utilizando 1,0 grama do derivado imobilizado (113,47 U/mg).

5. CONCLUSÕES

O conjunto de dados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. Entre as duas resinas testadas, o copolímero de estireno-divinilbenzeno apresentou uma morfologia mais favorável para imobilização da lipase *Candida rugosa*, provavelmente devido às interações hidrofóbicas entre a matriz e a enzima.
2. A metodologia de imobilização da lipase no suporte selecionado empregando heptano como meio dispersante favoreceu a obtenção de derivados imobilizados de lipase com elevada atividade e estabilidade operacional.
3. A imobilização da lipase no suporte selecionado não alterou significativamente as propriedades originais da lipase livre, sendo obtido um derivado imobilizado estável à estocagem por um período de seis meses a 4°C e apresentando uma estabilidade térmica superior ao da lipase na sua forma livre.
4. derivado imobilizado foi aplicado com sucesso na síntese do butirato de butila, apesar de ter apresentado um desempenho inferior ao alcançado por uma particular preparação de lipase imobilizada disponível comercialmente (Lipozyme).
5. A razão molar entre os materiais de partida foi um fator crítico para a obtenção de altos rendimentos de esterificação, requerendo um excesso de ácido butírico da ordem de 1,5 vezes em relação a concentração molar do butanol.
6. emprego de uma massa mínima de derivado de lipase imobilizada de 15% da massa total de reagentes envolvidos, garante a obtenção de rendimentos elevados de esterificação.
7. A estabilidade operacional do derivado imobilizado ficou demonstrada através da realização da síntese do butirato de butila em regime de bateladas consecutivas por um período de 288 horas (12 ciclos de 24 horas).

6. SUGESTÕES

Os resultados obtidos, nos levam a uma posição bem definida e de franco otimismo consoante ao prosseguimento das investigações tanto no que concerne à otimização da metodologia de imobilização em si, como também aos aspectos da aplicação dos derivados imobilizados em meios não aquosos. Para dar continuidade e complementar os estudos da imobilização e utilização da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STYDVB sugere-se:

1. Verificar as influências da granulometria, do teor de DVB e do grau de diluição na morfologia do copolímero e no rendimento de imobilização da lipase.
2. Estudar a influências do tamanho das cadeias do ácido carboxílico e do álcool no rendimento de reações de esterificação empregando a lipase imobilizada em STYDVB.
3. Aplicar o derivado de lipase imobilizada em outros tipos de reações catalisadas pelas lipases, como por exemplo, as interesterificações.
4. Testar a metodologia desenvolvida para imobilizar lipases de outras fontes microbianas, as quais apresentem uma maior estabilidade térmica na sua forma livre.
5. Estudar a possibilidade de imobilizar outros tipos de enzimas de interesse em biotecnologia no suporte de STYDVB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, I. L.; BENEZRA, L. **Ion Exchange Polymers in Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. v. 7, Interscience Publishers, New York, 1967.
- ALBRIGHT, R. L.; IARNELL, P.A. **Ion Exchange Polymers in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**. v. 8, Interscience Publishers, New York, 1986.
- ARSHADY, R.; FALLAH, F. Amphiphilic Gels for Peptide Synthesis. **Journal of Polymer Science**, Part A, v. 30, p. 1705, 1992.
- BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with Immobilized Lipases: State of the Art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BALTIERI, R.C. Síntese de Macro Esferas Porosas de Amino Polímeros: Aplicação em Imobilização de Biocompostos. **Tese de Mestrado**, FEQ-UNICAMP, 1996
- BASRI, M.; AMPON, K.; YUNUS, W.M.Z.W.; RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B. Stability of Hydrophobic Lipase Derivatives Immobilized on Organic Polymer Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.48, p.173-183, 1994.
- BASRI, M.; SALLEH, A.B.; AMPON, K.;WAN YUNUS, W.M.Z.; RAZAK, C.N.A . Modification of lipase by polyethylene glycol. **Biocatalysis**, v. 4, p.313-317, 1991
- BATTISTEL, E.; BIACHI, D.; ACCUNZO, A. D.; DE ALTERIS, E.; PARASCANDOLA, P. Effect of Polyvinylalcohols on the Thermostability of Lipase from *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.50, p. 161-173, 1995.
- BICAK, N., ATAY, T.; KOZA, G. Preparation of Polystyrene Resin with Pendant Vicinal Dioxime Groups. **Angew Makromolecular Chemistry**, v.83, p.197, 1992.
- BJÖRKLING, F.; GODTFREDSEN, E.; KIRK, O. The Future Impact of Industrial Lipases. **Trends in Biotechnology**, v. 9, p. 360-363, 1991.
- BOSLEY, J. A.; PEILOW, A. D. Immobilization of Lipases on Porous Polypropylene: Reduction in Esterification Efficiency at Low Loading. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 2, p. 107-111, 1997.

- BRADY, C. D.; METCALFE, L. D.; SLABOSZEWSKI, D. R.; FRANK, D. U.S. **Patent** No. 4.629.742, 1987.
- BROOKS, B. W. Basic Aspects and Recents Development in Suspension Polymerization. **Makromolecular Chemistry**, v.35, p.121, 1990.
- BULLOCK, C. Immobilized Enzymes. **Education Chemistry**, v. 26, p. 179, 1989.
- CABRAL, J. M. S.; KENNEDY, J. M.; NOVAIS, J. M. Investigation of the Binding Mechanism of Glucoamylase to Alkylamine Derivatives of Titanium IV-activated Porous Inorganic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p.343-348, 1982.
- CAO, G. S.; YANG, H.; MA, L.; GUO, S. Q. Enhancing Enzymatic Properties by the Immobilization Method. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.59, p.7-14, 1996.
- CARTA G.; GAINER, J.L.; GIBSON, M.E. Synthesis of Esters Using a Nylon-immobilized Lipase in Batch and Continuous Reactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.904-910, 1992.
- CASEY, J.; MACRAE, A R. Biotechnology and the Oleochemical Industry, **Inform**, v. 3, n. 2, p. 203, 1992.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. Fine Chemicals by Biotransformation Using y43 Lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.
- CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; ANDERSON, W. A. Production of Terpene Ester by Lipase in Non-conventional Media. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 7, 219-224, 1996.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; PEREIRA, E. B. Evaluation of Different Strategies for Lipase Catalysed Synthesis of Citronellyl Acetate. **Biotechnology Letters**, v.9, p. 229-232, 1997a.
- CASTRO H. F., OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F. Parâmetros Reacionais para a Síntese Enzimática do Butirato de Butila em Solventes Orgânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3. p. 237-241, 1997b.

- CASTRO H. F., OLIVEIRA, P.C., ZANIN, G. M. e SOARES, C.M.F. Immobilization of Lipase on Celite for Application in the Synthesis of Butyl Butyrate in Nonaqueous System. **Journal of American Oil Chemists' Society**, 1998 (in press).
- CHEETHAM, P. S. J. Principles of Industrial Biocatalysis and Bioprocessing In: **Handbook of Enzyme Biotechnology**, Edited A. Wiseman, T.J. Press, Great Britain, 3rd Edition, p. 419, 1995.
- CHIBATA, L. Production of L-Amino Acids, in Chibata, L. (ed): **Immobilized Enzymes: Research and Development**, p.168-178. John Wiley & Sons, New York, London, Sidney, Toronto, 1978.
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Manual de Bioquímica**. Ed. Edgard Blücker, Editora da USP, p. 117, 1972.
- COPPI, S.; BETTI, A. Correlation between Chemical and Physical Characteristics and Adsorption Properties of some Styrene Copolymers. **Journal of Chromatography**, v.55, p.330 1985.
- CYANAMID. Industrial Chemicals Division. **Boletim Informativo**. Bulk Handling and Storage N-methylol-Acrylamide, Wayne, New Jersey, 1987.
- DIAS, S.; VILAS-BOAS, L.; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, M.M.R. Production of Ethyl Butyrate by *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Polyurethane. **Biocatalysis**, v.3, p.21-34, 1991.
- DUSEK, K. **Polymer Network - Structure and Mechanical Properties**, A.J. Chompf, S. Newman (Eds), Plenum Press, New York, 1971.
- EIGTVED, P.; HANSEN, T.; SAKAGUCHI, H. Characteristics of Immobilized Lipase in Ester Synthesis and Effects of Water and Temperature in Various Reactions. In **AOCS/ JOCS Meeting**, Honolulu, 1986.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**, 3rd Edition, p. 21, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, 1997.
- FROST, G. M.; MOSS, D. A. **Production of Enzymes by Fermentation in Biotechnology**. Ed. RHEM, H. J. and REED, G. v. 7A, p. 71, VCH, 1987.

- FUKUI, S. TANAKA, A, IIDA, T. Immobilization of Biocatalysts for Bioprocesses in Organic Solvent Media. In: **Biocatalysis in Organic Media** (C. LANGE, J. TRAMPER, M.D.LILLY Editors), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 21-41, 1987
- FUKUNAGA, K.; MINAMIJIMA, N.; SUGIMURA, Y.; ZHANG, Z.; NAKAO, K. Immobilization of Organic Solvent-soluble Lipase in Nonaqueous Conditions and Properties of the Immobilized Enzymes. **Journal of Biotechnology**, v.52, p.81-88, 1996.
- GANDHI, NEENA N.; VIJAYALAKSHMI, V.; SAWANT, SUDHIRPRAKASH B.; JOSHI, JYESHTHARAJ B. **Chemical Engineering Journal**, v.61, n.2, p.149-156, 1996.
- GILBERT, J. E. Pseudomonas Lipases: Biochemical Properties and Molecular Cloning (Review). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p.634, 1993.
- GLÖCKNER, G. Polymer Characterization by Liquid Chromatography, **Journal of Chromatography Library**, Elsevier, New York, 1987.
- GRUBHOFFER, N., SCHLEITH, L. Modifizierte Ionenaustauscher als spezifische Adsorbentien. **Naturwiss**, v. 40, p. 508, 1953.
- GUIDELINES for Characterization of Immobilized Biocatalysts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 7, p. 304-307, 1983.
- HAEUPKE, K.; PIENKA, V. Porosity of Styrene-divinylbenzene Copolymers and ion Exchange Resin. **Journal of Chromatography**, v.102, p117, 1974.
- HARWOOD, J. The Versatility of Lipases for Industrial Uses. **Trends in Biotechnology Science-TIBS**, v. 14, 125 - 126, 1989.
- HALLING, P. J. Solvent Selection for Biocatalysis in Mainly Organic Systems: Predictions of Effects on Equilibrium Position. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 545-548, 1990.
- HAYES, D. G. The Catalytic Activity of Lipases Toward Hydroxy Fatty Acids - A Review. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 73, no. 5, p. 543, 1996.

- HOQ, M.M.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S.; FUNADA, T.; ISHIDA, S. Continuous Synthesis of Glycerides by Lipase in a Microporous Membrane Bioeractor. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 61, p.776, 1984.
- JACOBELLI, H., BARTHOLIN, M.; GUYOT, A. Styrene-divinylbenzene copolymers II - Influence of the Nature of the Diluent on the Texture of Macroporous Copolymers. **Angew Makromolecular Chemistry**, v.31, p.80, 1979.
- JANSSEN, A. E. M.; VAN DER PADT, A.; VANT' RIET, V. The Effect of Organic Solvents on the Equilibrium Position of Enzymatic Acylglycerol Synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n.1, p. 95-103, 1993.
- JESUS, P.C., JOÃO, J. J., SILVA, P.L.F., BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G. Organo-gel: Um Novo Sistema para a Imobilização de Lipases e sua Aplicação em Síntese Orgânica. **Química Nova**, v.20, n.6, p.664-672, 1997.
- JOHN, V. T.; ABRAHAM, G. Lipase Catalysis and its Applications. In: **Biocatalysis for Industry** (Dordick, J.S., Ed.). Plenum Press, New York, p. 193-217, 1991.
- KENNEDY, J. F.; ROIG, M.G. Principles of Immobilization of Enzymes. In: **Handbook of Enzyme Biotechnology**, Edited A. Wiseman, T.J. Press, Great Britain, 3rd Edition, p. 235, 246, 249, 1995.
- KLIBANOV, A. M. Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic Solvents, **Trends in Biotechnology Science-TIBS**, v. 14, p. 345, 1989.
- KOLARZ, B. N., TROCHIMCZUK, A., BRYJAK, J., WOJACZYNSKA, M., DZIEGIELEWSKI, A.; NOWORYTA, A. A Search for Optimal Acrylic Carriers for Immobilization of Penicillin Acylase. **Angew Makromolecular Chemistry**, v. 179, p. 174, 1990.
- KOSHIRO, S., SONOMOTO, K., TANAKA, A., FUKUI, S. Stereoselective Esterification of dl-menthol by Polyurethane-entrapped Lipase in Organic Media. **Journal of Biotechnonology** v. 2, p. 47, 1993.
- KOSKINEN, A. M. D; KLIBANOV, A. M. **Enzymatic Reactions in Organic Media**, p. 82, Ed. Blackie Academic & Professional, 1996.
- KUN, K. A.; KUNIN, R. Macroreticular Resins III - Formation of Macroreticular Styrene-divinylbenzene Copolymer. **Journal of Polymer Science**, 6, 2689, 1968.

- KUN, K. A.; KUNIN, R. The Pore Structure of Macroreticular ion exchange resins. **Journal of Polymer Science, Part C**, 16, 1457, 1967.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEGER, C. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 81-87, 1987.
- LANGRAND, G.; TRIANTAPHYLES, C.; BARATTI, J. Lipase Catalyzed Formation of Flavour Esters. **Biotechnology Letters**, v 10, n. 8, p 549 -554, 1988.
- LEUENBERGER, H. G. W. Biotransformation- A Useful Tool in Organic Chemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 753 - 768, 1990.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin-phenol-reagent. **Journal of Biology Chemistry**, 193, 263-275, 1951.
- MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and Future Applications of Lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 9, p.193- 217, 1985.
- MALCATA, F. X. ; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL JR, C.G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils - A Review. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.
- MANECKE, G. Reactive Polymers and their Use for the Preparation of Antibody and Enzyme Resins. **Pure and Applied Chemistry**, n. 4, p. 507-520, 1962.
- MANJON, A.; IBORRA, J. L.; AROCAS, A. A. Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 5, p. 339-344, 1991.
- MATTIASSON, B.; ADLERCREUTZ, P. Tailoring the microenvironment of enzymes in water-poor systems. **TIRTECH**, v. 9, p. 394-398, 1991.
- McLAREN, A. D.; ESTERMANN, E. F. The Adsorption and Reactions of Enzymes and Proteins on Kaolinite. **Archives of Biochemistry and Biophysical** v. 61, p. 158, 1956.
- MESSING, R.A. **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**. Academic Press, p. 63, 1975.

- MIKES, J. Porous Structure in Ion Exchange Materials. In: **Ion Exchange Process and Industry Papers Conference 1969**, Publ.Soc. Chem. Ind., 16, 1970.
- MILLAR, J. R. Some Aspects of Organic Polymer Sorbents and their Evaluation. **Journal of Polymer Science**, v. 68, p.167, 1980.
- MILLAR, J. R., SMITH, D. G., MARR, W. E. ; KRESSMAM, T.R.E. Solvent-Modified Polymers Networks Part I - The Preparation and Characterization of Expanded-network and Macroporous Styrene-Divinylbenzene Copolymers and their Sulfonates. **Journal of Chemical Society**, p. 218, 1963.
- MONOT, F. La Catalyse Enzymatique en Milieu Organique. **Revue de L'Institut Français du Pétrole**, v.49, n.2, 1994.
- MUSTRANTA, A.; FORSSELL, P. ; POUTANEN, K. Applications of Immobilized Lipases to Transesterification and Esterification Reactions in Nonaqueous Systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p. 133-139, 1993.
- NARAAN, S.V.; KLIBANOV, A M. Are Water-immiscibility and Apolarity of the Solvent Relevant to Enzyme Efficiency?. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 390-393, 1993
- NELSON, J.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of Invertase. **Journal of American Chemical Society**, v. 38, p. 1109-1116, 1916.
- NEVES, M.A.F.S. Síntese, Caracterização e Avaliação em Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Copolímeros de Estireno-divinilbenzeno. **Tese de mestrado**, Instituto de Macromoléculas Prof. Eloisa Mano, UFRJ, 1996.
- NISHIO, T.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMOTO, T.; KODELA, Y.; SAITO, Y.; INADA, Y. Terpene Alcohol Ester Synthesis by Polyethylene Glycol-modified Lipase in Benzene. **Biotechnology Letters** v.9, p. 187-190, 1987.
- NORIN, M.; BOUTELJE, J.; HOLMBERG, E.; HULT, K. Effect of Support Hydrophobicity on the Reaction Rate of Ester Synthesis in Cyclohexane. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 527-530, 1988.
- NOVO INDUSTRI. **Product Information**. B-347b- GB, 1986.
- NOVO NORDISK BIOINDUSTRIALS GROUP. A Ação das Enzimas. **BioTimes**. 1995.

- OTERO, C., PASTOR, E., FERNANDEZ, V.M., BALLESTEROS, A. Influence of the Support on the Reaction Course of Tributyrin Hydrolises Catalyzed by Soluble and Immobilized Lipases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 23, p. 237-247, 1990.
- PARK, K. S.; IHM, S. K. Characteristics of Phosphinated Styrene-divinylbenzene Copolymers Containing $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ for 1-Hexene Isomerization. **Polymer Bulletin**, v. 27, p. 399, 1992.
- PEDERSEN, S.; REESESENVEJ E Immobilized Lipase Preparation and Use thereof for Ester Synthesis, **Patent** WO 90/15868, 1990.
- PELZBAUER, Z.; LUKAS, J.; SVEC, F.; KÁLAN, J. Reactive Polymers XXV - Morphology of Polymeric Sorbents Based on Glycidil Methacrylate Copolymers. **Journal of Chromatography**, v. 171, p. 101, 1979.
- PERES, L. Desenvolvimento e Caracterização de Imunosorventes e Avaliação do Desempenho em Ensaios Imunoenzimáticos. **Tese de Mestrado**, FEQ-UNICAMP, 1986.
- PEREIRA, R.S. Fermento Biológico de Padaria (*Saccharomyces Cerevisiae*) e seu uso em Sínteses Assimétricas. **Química Nova**, v. 18, n.5, p. 452-459, 1995.
- PIMENTEL, M. C. B. Produção de Lipases por Fungos Filamentosos: Estudos Cinéticos e Síntese de Ésteres. **Tese de Doutorado**, IQ-UNICAMP, 1996.
- POULSEN, P.B. Current Applications of Immobilized Enzymes for Manufacturing Purposes. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, n. 1, p.121-140, 1984.
- POSORKE, L. H.; LEFEBVRE, G. K.; MILLER, C. A.; HANSEN, T. T.; GLENNING, B. L. Process considerations of continuous fat modification with na immobilized lipase. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 6, p.922-930, 1988.
- RESLOW, M., ADLERCREUTZ, P.; MATTIASON, B. On the Importance of the Support Material for Bioorganic Synthesis - Influence of Material Partition Between Solvent, Enzyme and Solid Support in Water-Poor Reaction Media. **European Journal of Biochemistry**, v. 172, p.573-578, 1988.

- RUA, M. L.; BALLESTEROS, A. Rapid Purification of Lipase Isoenzymes for *Candida rugosa*. **Biotechnology Techniques**, v. 8, p. 21-26, 1994.
- RUA, M. L., DIAS-MAURINO, T., FERNANDEZ, V.M., OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and Characterization of two Distinct Lipases from *Candida cylindracea*. **Biochemistry and Biophysical Acta**, n. 1156, p. 181-189, 1993.
- RUCKENSTEIN, E; WANG, X. Lipase Immobilized on Hydrophobic Porous Polymer Supports Prepared by Concentrated Emulsion Polymerization and Their Activity in the Hydrolysis of Triacylglycerides. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 821-828, 1993.
- SEDEREL, W. L.; DE JONG, G. J. Styrene-divinylbenzene Copolymers - Construction of Porosity in Styrene-divinylbenzene Matrices. **Journal of Applied Polymer Science**. v.17, p. 2935, 1973.
- SHERINGTON, D.C. The Effect of Polymer Structure on the Reactivity of Bound Functional Groups. **Nouveau J. Chim.** v.6, p. 661, 1982.
- SOARES, C.M.F., CASTRO, H.F., MORAES, F.F. e ZANIN, G.M. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1998. (in press).
- SOLEWICK, E. Biotecnologia: Enzimas na Síntese Orgânica. **Informativo INT**, v. 19, n. 40, p.20-25, 1987.
- STRYER, L. **Bioquímica**. p. 45, Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1992.
- TAGER, A. **Physical-Chemistry of Polymers**. Mir Publishers, Moscou, Cap. 20, 1972.
- TANAKA, A.; SONOMOTO, R. Immobilized Biocatalyst in Organic Solvents. **Chemtech**, February, p.112-142, 1990.
- TREVISAN, H. C. Imobilização de Glicose Oxidase em Suportes Silícicos. **Tese de Mestrado**. FEQ/UNICAMP, 1990.
- VÉZINA, C. Biotransformations. In: **Basic Biotechnology**. Edited by J. D. Bu'Lock, B. Kristiansen, Academic Press, London, pp. 463 - 481, 1987.

- VULFSON, E. N. Enzymatic Synthesis of Food Ingredients in Low Water Media. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, p. 209-215, 1993.
- VULFSON, E. N. Industrial Applications of Lipases. In: **Lipase: Their Structure, Biochemistry and Application** (Woolley, P. and Petersen, S. B., Eds). Cambridge University Press, Cambridge, U.K., p.271-288, 1994.
- YAN WU, X.; JÄÄSKELÄINEN, S.; LINKO, Y. An Investigation of Crude Lipases for Hydrolysis, Esterification and Transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p. 226-231, 1996.
- YANG, Z.; ROBB, D.A. Partition Coefficients of Substrates and Products and Solvent Selection for Biocatalysis Under Nearly Anhydrous Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.43, p. 365-370, 1994.
- YUNUS, W.M.Z.W.; SALLEH, A.B.; BASRI, M.; AMPON, K.; RAZAK, C.N.A. Preparation and Immobilization of Lipase on Poly(methyl acrylate- methyl methacrylate-divinylbenzene) Beads for Lipid Hydrolysis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 24, p. 19-23, 1996.
- WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Improved Activity Retention of Enzymes Deposited on Solid Supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 171-178, 1993
- WELSH, F. H.; MURRAY, W. D.; WILLIAMS, R. E. Microbiological and Enzymatic Production of Flavour and Fragrance Chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 105-169, 1989.
- WHEATON, R. M.; SLAMSTER, A.H. Ion Exchange in **Encyclopedia of Chemical Technology**, v. 13, Interscience Publishers, New York, 1981.
- WHISTESIDES, G.M.; WONG, C.H. Enzymes as Catalysts in Synthetic Organic Chemistry. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.24, n.8, p.617-718, 1985.
- WISDOM, R. A., DUNHILL, P., LILLY, M. D. Enzymic Interesterification of Fats: Laboratory and Pilot-scale Studies with Immobilized Lipase from *Rhizopus arrhizus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1081-1085, 1987.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. **The Journal of Biology and Chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.

APÊNDICES

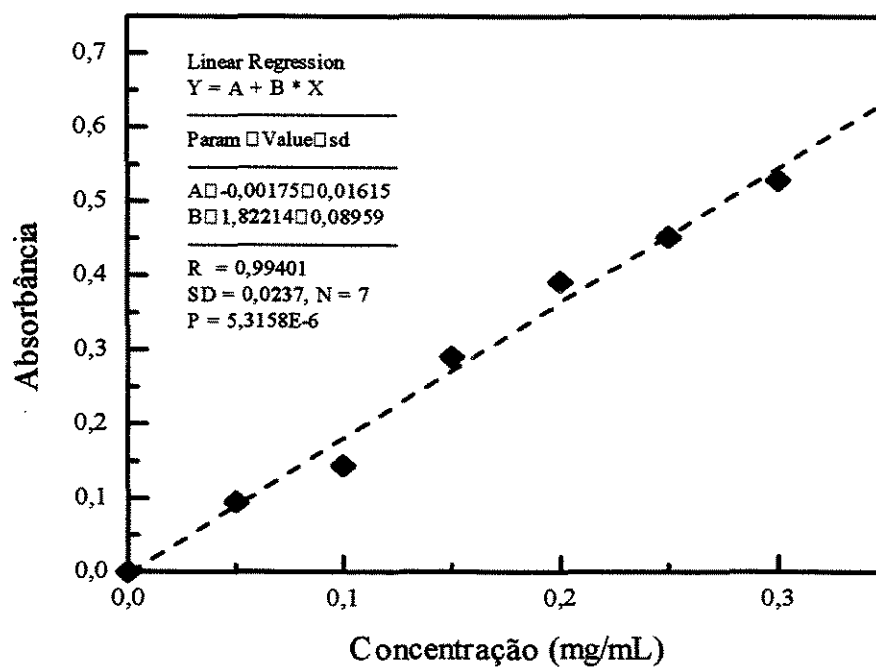
APÊNDICE 1

❧ Características das preparações comerciais de lipase empregada nos testes descritos neste trabalho

| <i>Lote n^o</i> | <i>Proteína (mg/g)</i> | <i>Atividade (U/mg)</i> | <i>Atividade específica</i> | <i>Umidade (%)</i> |
|---------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1 | 109,8 | 724 ^a | 659,38 | 6,35 |
| 2 | 109,8 | 1089 ^b | 991,80 | 5,00 |

^aValor médio: 740; 682 e 750 Unidades de atividade

^bValor médio: 1070, 1206 e 991 Unidades de Atividade



Curva de Calibração para dosagem de proteína pelo Método de Lowry

APÊNDICE 2

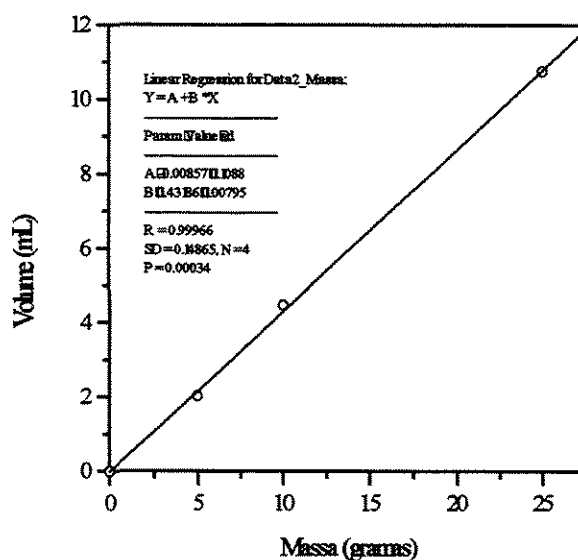
| | | | | |
|---|----------------------------|---|-----------------------------|-----------------------|
| FILE 8 | | QUANTIFICAÇÃO DO BUTANOL-BUTIRATO DE BUTILA | | |
| PI - HEXANOL-1 | | SOLVENTE HEPTANO | | |
| AMOSTRA: SEM DILUIÇÃO MISTURAR 1 X 1 COM PI | | INJETAR 1 µL | | |
| TEMPERATURAS | COLUNA 60° C | IONIZADOR 190° C | VAPORIZADOR 190° C | |
| VAZÃO | NITROGÊNIO 16 DA ESCALA | HIDROGÊNIO 27 mL/min. | AR SINTÉTICO 300 mL/min. | |
| ATENUAÇÃO DO CROMATÓGRAFO: 1 X 1K | | | | |
| CALIBRAÇÃO | | | | |
| IDNO | NOME | TEMPO | FATOR | CONCENTRAÇÃO (g/L) |
| 1 | PI | 10,2 | 1,000 | 22,5 |
| 2 | BUT | 3,5 | 1, 5372 | 24,96 |
| 3 | B.B | 5,6 | 1, 6303 | 24,5 |

APÊNDICE 3

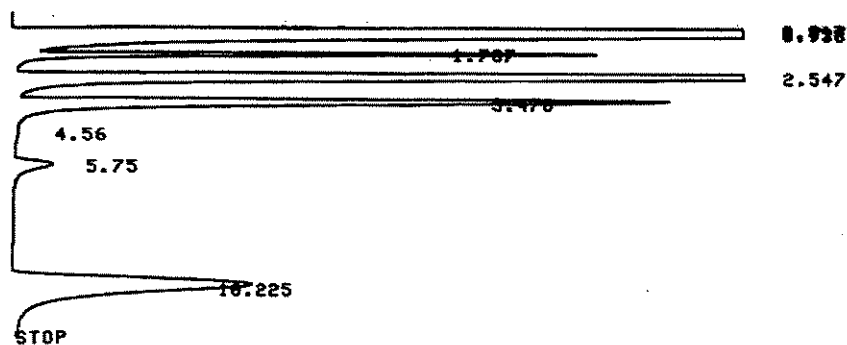
Determinação dos Coeficientes de Partição

- Reagentes: Butanol 300mM (22,2 g/ml)
 Ácido Butírico 160mM (14,08 g/ml)
 Massa de suporte: 0,26g (densidade média: 0,4264g/ml)

| BUTANOL | | | | |
|-----------------|---------------|---------------|-------------|-------------------------|
| C_0 (g/ml) | C (g/ml) | V_0 (ml) | V (ml) | P (coef. partição) |
| 22,2 | 17,34 | 5,00 | 5,61 | 2,30 |
| | 17,48 | | | 2,21 |
| | 17,08 | | | 2,45 |
| Valor médio | | | | 2,32 |
| ÁCIDO BUTÍRICO | | | | |
| C_0 (g/ml) | C (g/ml) | V_0 (ml) | V (ml) | P (coef. partição) |
| 14,08 | 11,65 | 5,00 | 5,61 | 1,71 |
| | 11,73 | | | 1,64 |
| | 11,75 | | | 1,63 |
| Valor médio | | | | 1,66 |



Curva de calibração para determinação da densidade do suporte

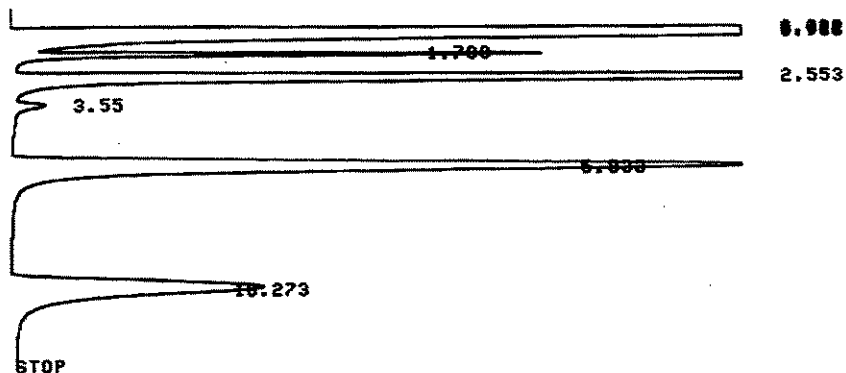


CHROMATOPAC C-R3A
 SAMPLE NO 8
 REPORT NO 561
 IS WT 22.5

FILE 9
 METHOD 43
 SAMPLE WT 100

| PKNO | TIME | AREA | NK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|--------|---------|----|------|---------|------|
| 1 | 0.817 | 2544791 | | | | |
| 2 | 0.933 | 573183 | SV | | | |
| 3 | 1.787 | 22572 | T | | | |
| 4 | 2.547 | 286863 | V | | | |
| 5 | 3.478 | 54156 | SV | 2 | 25.9768 | BUT |
| 6 | 4.56 | 115 | T | | | |
| 7 | 5.75 | 5174 | | | | |
| 8 | 10.225 | 58728 | | 1 | | PI |
| TOTAL | | 3456700 | | | 25.9768 | |

START



CHROMATOPAC C-R3A
 SAMPLE NO 8
 REPORT NO 560
 IS WT 22.5

FILE 9
 METHOD 43
 SAMPLE WT 100

| PKNO | TIME | AREA | NK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|--------|---------|----|------|------|------|
| 1 | 0.822 | 2541884 | | | | |
| 2 | 0.933 | 589884 | SV | | | |
| 3 | 1.788 | 20618 | T | | | |
| 4 | 2.553 | 289281 | SV | | | |
| 5 | 3.55 | 2418 | T | 2 | 1.00 | BUT |
| 6 | 5.833 | 183756 | | | | |
| 7 | 10.273 | 54468 | | 1 | | PI |
| TOTAL | | 3521500 | | | 1.00 | |

APÊNDICE 4

Imobilização da lipase em PNMA

Suporte: PNMA

Granulometria: 42 mesh (não perolizada)

Metodologia de Imobilização:

- ✎ Enzima oferecida para imobilização: 10 ml de uma solução contendo 27,45 mg de proteína (181.000U)
- ✎ Meio de dispersão: Solução Tampão Fosfato de Sódio 0,1M pH 7,0.
- ✎ Tempo de Contato: 2h sob agitação seguido de filtração e lavagem com tampão fosfato de sódio 0,1M.

Quantificação de proteína perdida no procedimento de imobilização.

| <i>Exp. n^o</i> | <i>Sobrenadante (mg)*</i> | <i>Filtrado 1 (mg)*</i> | <i>Filtrado 2 (mg)*</i> | <i>Filtrado 3 (mg)*</i> | <i>Filtrado 4 (mg)*</i> | <i>Total (mg)</i> | <i>RP (%)</i> |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | 10,49 | 5,62 | 1,41 | 0,33 | 0,29 | 18,14 | 33,92 |
| 2 | 11,48 | 5,06 | 1,56 | 1,03 | 0,43 | 19,56 | 28,74 |
| 3 | 10,23 | 4,83 | 1,35 | 1,12 | 0,01 | 17,54 | 36,10 |
| Valor médio | 10,73 | 5,17 | 1,44 | 0,83 | 0,25 | 18,41 | 32,92 |

* Concentração X Volume de cada filtrado

RP: Diferença entre a proteína oferecida para imobilização e o total de proteína encontrada nos filtrados dividido pela quantidade de proteína oferecida para imobilização.

Recuperação da atividade lipolítica no procedimento de imobilização empregando PNMA como suporte

| <i>Exp. n^o</i> | <i>MS (g)</i> | <i>Atividade (U/g)</i> | <i>Uads (U)</i> | <i>RA (%)</i> |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------|-------------------|
| 1 | 1,13 | 3260 | 3686 | 2,00 |
| 2 | 1,44 | 2892 | 4165 | 2,30 |
| 3 | 1,47 | 1867 | 2744 | 1,50 |
| Valor médio | 1,34 | 2673 | 3532 | 1,90 |

MS: Massa seca do derivado imobilizado

Atividade: Representa o número de unidades (U) por grama de lipase imobilizada (massa seca)

Uads: Refere-se a atividade total obtida (*Atividade x MS*)

RA: Rendimento em termos de atividade. Relação entre a *Uads* e atividade oferecida para imobilização

APÊNDICE 5

Imobilização da lipase em STYDVB

Suporte: STYDVB

Granulometria: 100-140 mesh (perolizado)

Metodologia de Imobilização:

- Enzima oferecida para imobilização: 20 ml de uma solução contendo 54,50 mg de proteína (362.000U)
- Meio de dispersão: Solução Tampão Fosfato de Sódio 0,1M pH 7,0
- Tempo de Contato: 2h sob agitação seguido de filtração e lavagem com tampão fosfato de sódio 0,1M.

Quantificação de proteína perdida no procedimento de imobilização

| <i>Exp. n^o</i> | <i>Sobrenadante (mg)</i> | <i>Filtrado 1 (mg)</i> | <i>Filtrado 2 (mg)</i> | <i>Filtrado 3 (mg)</i> | <i>Filtrado 4 (mg)</i> | <i>Total (mg)</i> | <i>RP (%)</i> |
|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | 31,16 | 7,90 | 1,30 | 0,30 | 0,01 | 40,67 | 25,38 |
| 2 | 23,86 | 5,83 | 2,22 | 0,94 | 0,01 | 32,86 | 39,71 |
| Valor médio | 27,51 | 6,87 | 1,76 | 0,62 | 0,01 | 36,77 | 32,55 |

* Concentração X Volume de cada filtrado

RP: Diferença entre a proteína oferecida para imobilização e o total de proteína encontrada nos filtrados dividido pela quantidade de proteína oferecida para imobilização.

Recuperação da atividade lipolítica no procedimento de imobilização empregando STYDVB como suporte

| <i>MS (g)</i> | <i>Atividade (U/g)</i> | <i>Uads (U)</i> | <i>RA (%)</i> |
|--------------------|----------------------------|---------------------|-------------------|
| 2,32 | 19160 | 44451 | 12,28 |
| 2,36 | 27145 | 64062 | 18,20 |
| Valor médio | 23153 | 54257 | 15,24 |

MS: Massa seca do derivado imobilizado

Atividade: Representa o número de unidades (U) por grama de lipase imobilizada (massa seca)

Uads: Refere-se a atividade total obtida ($Atividade \times MS$)

RA: Relação entre a Uads e atividade oferecida para imobilização.

APÊNDICE 6

Verificação da eficiência da lipase imobilizada em PNMA e STYDVB na Síntese do Butirato de Butila**Condições operacionais**

✎ Lipase imobilizada em resina PNMA

Atividade: 3,69 U/ mg seca

Umidade: 70,0%

✎ Lipase imobilizada em resina STY-DVB

Atividade: 9,41 U/ mg seca

Umidade: 32%

✎ Substrato:

Ácido Butírico:Butanol

Volume: 20 ml

✎ Reações efetuadas:

Reação 1: 50 mg de lipase livre + 20 ml de substrato;

Reação 2: 2,65g de lipase imobilizada em PNMA + 20 ml de substrato;

Reação 3: 1,0 grama de lipase imobilizada em STYDVB + 20 ml de substrato.

Todas as reações foram incubadas numa temperatura de 37°C, sob agitação.

| <i>Reação n^o</i> | <i>Tempo (horas)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>Consumo AcBut (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Consumo ButOH (mM)</i> | <i>Conversão ButOH (%)</i> |
|---------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 0 | 180 | - | 104 | - | - |
| | 6 | 154 | 26 | 64 | 4,0 | 38,96 |
| | 22 | 68 | 112 | 9,4 | 94,6 | 90,90 |
| | 30 | 43 | 137 | 5,4 | 98,6 | 94,80 |
| 2 | 0 | 227 | - | 95 | - | 0 |
| | 6 | 213 | 14 | 95 | - | 0 |
| | 22 | - | - | 62 | 33 | 34,85 |
| | 30 | 210 | 17 | 68 | 27 | 28,44 |
| | 48 | 201 | 26 | 53 | 42 | 44,24 |
| | 72 | 198 | 29 | 30 | 65 | 68,70 |
| 3 | 0 | 398 | 0 | 162 | 0 | 0 |
| | 12 | 329 | 69 | 94 | 68 | 41,73 |
| | 24 | 295 | 103 | 42 | 120 | 73,95 |
| | 36 | 233 | 165 | 28 | 134 | 82,72 |
| | 48 | 204 | 193 | 8 | 144 | 95,24 |

APÊNDICE 7

Imobilização em dispersante orgânico

Suporte: STYDVB

Granulometria: 100-140 mesh (perolizado)

Metodologia de Imobilização:

- ✦ Enzima oferecida para imobilização: 0,5g de lipase contendo 54,50 mg de proteína (489.000U)
- ✦ Meio de dispersão: Heptano
- ✦ Tempo de Contato do suporte com o meio: 30 minutos sob agitação
- ✦ Tempo de Dispersão: 2h sob agitação seguido de filtração em papel filtro e filtro de nylon 420 mesh e lavagem com o dispersante utilizado.

Quantificação de proteína perdida no procedimento de imobilização

| <i>Meio filtrante</i> | <i>Sobrenadante (mg)</i> | <i>Filtrado 1 (mg)</i> | <i>Total (mg)</i> |
|-----------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Papel de filtro | 0 | 0 | 0 |
| Tela de nylon | 1,64 | 2,93 | 4,57 |

| <i>Meio filtrante</i> | <i>Proteína perdida (mg)</i> | <i>Pads (mg)</i> | <i>RP (%)</i> |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| Papel de filtro | 0 | 54 | 100 |
| Tela de nylon | 4,57 | 49,93 | 92 |

Recuperação da atividade lipolítica no procedimento de imobilização empregando STY-DVB como suporte

| <i>Meio filtrante</i> | <i>MS (g)</i> | <i>Atividade (U/g)</i> | <i>Uads (U)</i> | <i>RA (%)</i> |
|-----------------------|-------------------|----------------------------|---------------------|-------------------|
| Papel de filtro | 2,60 | 156103 | 405870 | 83 |
| Tela de nylon | 2,45 | 91493 | 224159 | 46 |

APÊNDICE 8

Estabilidade Operacional do Derivado imobilizado em STY-DVB obtido em tampão fosfato pH 7,0 como meio dispersante

▮ Substrato: Ácido Butírico 406mM e Butanol 223mM

▮ Reação 1- 0,5g de lipase imobilizada em STYDVB (19,16U/mg e 19% de umidade)

| <i>Reciclo</i> | <i>Tempo de reação (h)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>Consumo AcBut (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Consumo ButOH (mM)</i> | <i>Conversão ButOH (%)</i> |
|----------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|----------------------------|
| R0 | 0 | 486 | - | 186 | - | - |
| | 24 | 250 | 236 | 100 | 86 | 46 |
| | 40 | 170 | 316 | 2 | 184 | 99 |
| | | | | | | |
| R1 | 0 | 398 | - | 216 | - | - |
| | 24 | 352 | 46 | 162 | 54 | 25 |
| | 40 | 348 | 4 | 157 | 59 | 27 |
| | | | | | | |
| R2 | 0 | 397 | - | 216 | - | - |
| | 24 | 385 | 12 | 188 | 28 | 13 |
| | 40 | 384 | 13 | 188 | 28 | 13 |

▮ Reação 2- 0,5g de lipase imobilizada em STYDVB (27,15U/mg e 33% de umidade).

| <i>Reciclo</i> | <i>Tempo de reação (h)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>Consumo AcBut (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Consumo ButOH (mM)</i> | <i>Conversão ButOH (%)</i> |
|----------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|----------------------------|
| R0 | 0 | 447 | - | 173 | - | - |
| | 24 | 227 | 220 | 87 | 86 | 50 |
| | 40 | 125 | 322 | 1,2 | 172 | 99 |
| | | | | | | |
| R1 | 0 | 397 | - | 213 | - | - |
| | 24 | 352 | 45 | 160 | 53 | 25 |
| | 40 | 350 | 47 | 154 | 59 | 28 |
| | | | | | | |
| R2 | 0 | 396 | - | 216 | - | - |
| | 24 | 386 | 10 | 185 | 31 | 14 |
| | 40 | 385 | 11 | 185 | 31 | 14 |

Uso repetitivo de lipase imobilizada em STY-DVB (heptano como meio dispersante)

✎ Substrato:

Ácido Butírico: 52,8g/l (600 mM)

Butanol: 29,6g/l (400 mM)

Teor de água: 802 ppm

✎ Imobilizado: 113,47U/mg e 7,5% água

✎ Reação: 0,5g de lipase imobilizada + 20 ml de substrato

| <i>Reciclo</i> | <i>Tempo reação (horas)</i> | <i>Água (ppm)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>Cons Ac But. (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Cons. ButOH (mM)</i> | <i>Conv. ButOH (%)</i> | <i>Butirato Butila (g/l)</i> |
|----------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| R0 | 0 | 802 | 602 | - | 405 | - | - | - |
| | 24 | 655 | 182 | 420 | 14 | 391 | 97 | 57 |
| | | | | | | | | |
| R1 | 0 | 1119 | 595 | - | 405 | - | - | - |
| | 24 | 623 | 193 | 402 | 14 | 391 | 97 | 54 |
| | | | | | | | | |
| R2 | 0 | 1144 | 602 | - | 405 | - | - | - |
| | 24 | 640 | 170 | 432 | 14 | 391 | 97 | 53 |
| | | | | | | | | |
| R3 | 0 | | 602 | - | 378 | - | - | - |
| | 24 | 657 | 204 | 398 | 46 | 332 | 88 | 53 |
| | | | | | | | | |
| R4 | 0 | 1065 | 660 | - | 662 | - | - | - |
| | 24 | 596 | 204 | 456 | 32 | 630 | 95 | 55 |
| | | | | | | | | |
| R5 | 0 | 998 | 523 | - | 405 | - | - | - |
| | 24 | 925 | 159 | 364 | 62 | 343 | 85 | 35 |
| | | | | | | | | |
| R6 | 0 | 891 | 545 | - | 365 | - | - | - |
| | 24 | 525 | 250 | 295 | 65 | 300 | 82 | 32 |

APÊNDICE 9

Cálculo da composição teórica de C, H e N baseada na razão de enzima suporte empregada (1:4).

| <i>Elemento (%)</i> | <i>Suporte (A)</i> | <i>Lipase (B)</i> | <i>Massa total (C)</i> | <i>D* (%)</i> |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| Carbono | 91,30 | 25,04 | 5 | 78,05 |
| Hidrogênio | 8,12 | 4,88 | 5 | 7,47 |
| Nitrogênio | 2,21 | 2,64 | 5 | 2,31 |

(*) Média ponderada: $D (\%) = \frac{(A \times 4) + (B \times 1)}{C}$

APÊNDICE 10

Estudo da influencia do pH e da temperatura na atividade da lipase imobilizada em STYDVB

▼ pH's estudados: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0

| <i>pH</i> | <i>Solúvel</i> | | <i>Imobilizada</i> | |
|-----------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Atividade (U/mg)</i> | <i>Atividade relativa %</i> | <i>Atividade (U/ mg)</i> | <i>Atividade relativa (%)</i> |
| 7,0 | 1001,90 | 68 | 113,47 | 93,60 |
| 7,5 | 1405,30 | 93,7 | 121,23 | 100 |
| 8,0 | 1500,00 | 100 | 93,71 | 77,30 |
| 8,5 | 1094,70 | 72,9 | 103,05 | 85,0 |
| 9,0 | | | 84,25 | 69,50 |

▼ Temperaturas estudadas: 37, 40, 50 e 60°C

| <i>Temperatura (°C)</i> | <i>Atividade (U/g)</i> | <i>Média (U/g)</i> |
|-----------------------------|----------------------------|------------------------|
| 37 | 113,45 | 113,47 |
| | 113,48 | |
| 40 | 160,97 | 161,12 |
| | 161,27 | |
| 50 | 235,88 | 235,98 |
| | 236,09 | |
| 60 | 113,98 | 113,82 |
| | 113,65 | |

| <i>T (°C)</i> | <i>Solúvel</i> | | <i>Imobilizada</i> | |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Atividade (U/mg)</i> | <i>Atividade relativa (%)</i> | <i>Atividade (U/ mg)</i> | <i>Atividade relativa (%)</i> |
| 37 | 1770,67 | 73,72 | 113,47 | 48,08 |
| 40 | 2410,15 | 100,00 | 161,12 | 68,27 |
| 50 | 1480,67 | 61,41 | 235,98 | 100,00 |
| 60 | 1100,17 | 45,65 | 113,81 | 48,22 |

APÊNDICE 11

Estabilidade térmica da lipase imobilizada em STYDVB

Atividade da lipase imobilizada sem tratamento térmico: 113,47 U/mg

Metodologia:

↘ 0,1g de IME em 3ml de tampão Fosfato de Sódio 0,1M mantidos sob agitação nas temperaturas de 40, 50 e 60°C durante 1h e 2h seguido de dosagem da atividade residual a 37°C

| <i>Temperatura (°C)</i> | <i>Tempo (h)</i> | <i>Atividade (U/mg)</i> | <i>Média (U/g)</i> |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| 40 | 1 | 110,13 | 115,87 |
| | | 121,60 | |
| | 2 | 108,10 | 117,32 |
| | | 126,53 | |
| 50 | 1 | 116,50 | 119,05 |
| | | 121,60 | |
| | 2 | 84,73 | 84,53 |
| | | 84,33 | |
| 60 | 1 | 52,13 | 51,90 |
| | | 51,67 | |
| | 2 | 36,27 | 32,42 |
| | | 32,20 | |

| <i>Temperatura (°C)</i> | <i>Lipase solúvel</i> | | <i>Lipase Imobilizada</i> | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Atividade (U/mg)</i> | <i>Atividade Relativa (%)</i> | <i>Atividade (U/mg)</i> | <i>Atividade Relativa (%)</i> |
| 37 | 1002,50 | 100,00 | 113,47 | 100,00 |
| 40 | 243,60 | 23,60 | 115,87 | 100,00 |
| 50 | 115,20 | 11,50 | 119,05 | 100,00 |
| 60 | 58,80 | 5,86 | 51,90 | 45,74 |

APÊNDICE 12

Verificação da Estabilidade da Lipase Imobilizada em STYDVB em função do tempo de estoque

✧ Lipase imobilizada em resina STY-DVB

Atividade: 99,81U/ mg seca

Umidade: 7,5%

✧ Reação efetuada: Hidrólise conforme descrito no item 4.4.2

| <i>Tempo (dias)</i> | <i>Atividade (U/mg)</i> | <i>Atividade Média (U/mg)</i> | <i>Perda de atividade (%)</i> |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 30 | 113,08 | | |
| | 87,89 | | |
| | 93,45 | 98,14 | 1,67 |
| | | | |
| 60 | 105,18 | | |
| | 92,13 | | |
| | 97,02 | 98,11 | 1,70 |
| | | | |
| 90 | 97,95 | | |
| | 96,97 | | |
| | 98,02 | 97,95 | 1,86 |
| | | | |
| 120 | 95,86 | | |
| | 99,01 | | |
| | 98,71 | 97,86 | 1,95 |
| | | | |
| 180 | 93,98 | | |
| | 98,37 | | |
| | 101,05 | 97,80 | 2,01 |
| | | | |
| Valor médio | | 97,97 | 1,84 |

APÊNDICE 13

Influência da razão molar dos reagentes na conversão molar do butanol

✎ Substratos:

Reação 1: Ác. Butírico 90mM e Butanol 180mM

Reação 2: Ác. Butírico 180mM e Butanol 180mM;

Reação 3: Ác. Butírico 290mM e Butanol 180mM;

Reação 4: Ác. Butírico 500mM e Butanol 180mM;

✎ 0,25 grama de lipase imobilizada (113470 U e 6% de água)

| Reação | Tempo de reação (horas) | Água (ppm) | AcBut (mM) | Consumo Ac. But. (mM) | ButOH (mM) | Consumo ButOH (mM) | Conversão ButOH (%) |
|--------|-------------------------|------------|------------|-----------------------|------------|--------------------|---------------------|
| R1 | 0 | 387,00 | 50,00 | - | 93,00 | - | |
| | 24 | 802,00 | 7,00 | 43,00 | 87,00 | 6,00 | 6,50 |
| R2 | 0 | 370,00 | 180,00 | - | 180,00 | - | |
| | 24 | 364,00 | 108,00 | 72,00 | 84,00 | 96,00 | 53,00 |
| R3 | 0 | 394,00 | 292,00 | - | 180,00 | - | |
| | 24 | 369,00 | 43,00 | 249,00 | 0 | 180,00 | 100,00 |
| R4 | 0 | 402,00 | 505,00 | - | 180,00 | - | |
| | 24 | 367,00 | 200,00 | 305,00 | 0 | 180,00 | 100,00 |

APÊNDICE 14

Influência da massa de lipase imobilizada na conversão molar do butanol

▮ Substratos: Ác. Butírico 600mM e Butanol 400mM;

Reação 1: 1,00% da massa de substrato;

Reação 2: 5,00% da massa de substrato;

Reação 3: 10,00% da massa de substrato;

Reação 4: 15,00% da massa de substrato;

Reação 5: 25,00% da massa de substrato;

Reação 6: 60,00% da massa de substrato;

▮ 0,25 grama de lipase imobilizada (113,47U/mg e 6% de água)

| <i>Reação n^o</i> | <i>Tempo (horas)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>Cons. Ac. But. (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Cons. ButOH (mM)</i> | <i>Conversão ButOH (%)</i> |
|---------------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| R1 | 0 | 602,00 | - | 400 | - | - |
| | 24 | 592,00 | 10,00 | 332 | 68 | 18 |
| R2 | 0 | 600,00 | - | 400 | - | - |
| | 24 | 535,00 | 65 | 320 | 80 | 20 |
| R3 | 0 | 602 | - | 405 | - | - |
| | 24 | 295 | 307 | 95 | 310 | 77 |
| R4 | 0 | 602 | - | 405 | - | - |
| | 24 | 182 | 420 | 14 | 391 | 97 |
| R5 | 0 | 602 | - | 405 | - | - |
| | 24 | 182 | 420 | 14 | 391 | 97 |
| R6 | 0 | 602 | - | 405 | - | - |
| | 24 | 170 | 432 | 14 | 391 | 97 |

APÊNDICE 15

Comparação do desempenho da lipase livre, imobilizada em STYDVB e Lipozyme

Lipase livre de *Candida rugosa* (37,5 mg)

| <i>Tempo (horas)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Cons. ButOH (mM)</i> | <i>Conv. ButOH (%)</i> | <i>TaxaConv. mM/h/g</i> |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0 | 480 | 320 | - | - | |
| 2 | 478 | 305 | 15 | 4,7 | 200 |
| 4 | 470 | 272 | 48 | 15 | 320 |
| 6 | 470 | 257 | 63 | 20 | 280 |
| 8 | 469 | 245 | 75 | 23 | 250 |
| 10 | 432 | 195 | 125 | 39 | 333 |
| 14 | 360 | 157 | 163 | 51 | 310 |
| 24 | 192 | 120 | 200 | 63 | 222 |
| 48 | 86 | 70 | 250 | 78 | 138 |
| | | | | | 256,6 |

Lipase imobilizada em STYDVB (0,40 gramas)

| <i>Tempo (horas)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Cons. ButOH (mM)</i> | <i>Conv. ButOH (%)</i> | <i>TaxaConv. mM/h/g</i> |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0 | 595 | 410 | - | - | |
| 4 | 589 | 388 | 22 | 5,37 | 13,75 |
| 6 | 370 | 307 | 103 | 25,14 | 32,19 |
| 8 | 344 | 240 | 169 | 41,46 | 35,21 |
| 16 | 250 | 190 | 219 | 53,62 | 34,22 |
| 20 | 180 | 150 | 259 | 63,28 | 32,38 |
| 24 | 148 | 120 | 289 | 70,70 | 30,11 |
| 28 | 106 | 97 | 321 | 76,26 | 27,86 |
| 40 | 93 | 47 | 363 | 88,46 | 22,69 |
| 48 | 66 | 33 | 377 | 91,95 | 19,64 |
| | | | | | 27,56 |

Lipozyme (0,12 gramas)

| <i>Tempo (horas)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Cons. ButOH (mM)</i> | <i>Conv. ButOH (%)</i> | <i>TaxaConv. mM/h/g</i> |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0 | 443 | 286 | - | - | |
| 2 | 443 | 215 | 71 | 24,80 | 294 |
| 4 | 421 | 180 | 106 | 37,06 | 221 |
| 6 | 385 | 147 | 139 | 48,60 | 193 |
| 8 | 345 | 119 | 167 | 58,39 | 174 |
| 10 | 146 | 93 | 193 | 67,48 | 161 |
| 12 | 98 | 70 | 216 | 75,52 | 150 |
| 20 | 90 | 5 | 281 | 98,25 | 117 |
| 24 | 57 | 3 | 283 | 98,95 | 98 |
| | | | | | 155,6 |

APÊNDICE 16

Estabilidade operacional do derivado imobilizado (obtido em heptano como meio dispersante)

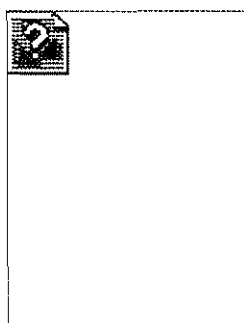
▣ Substrato: Ac Butírico 560mM e Butanol 360mM

▣ 1,0 grama de lipase imobilizada (113,47 U/mg e 6% de água)

| <i>Reciclo</i> | <i>Tempo (horas)</i> | <i>Água (ppm)</i> | <i>AcBut (mM)</i> | <i>Cons. Ac. But. (mM)</i> | <i>ButOH (mM)</i> | <i>Cons. ButOH (mM)</i> | <i>Conv. ButOH (%)</i> |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| R ₀ | 0 | 370 | 570 | - | 350 | - | |
| | 24 | 366 | 93 | 477 | 16 | 334 | 95,43 |
| R ₁ | 0 | 374 | 560 | - | 300 | - | |
| | 24 | 370 | 86 | 474 | 15 | 285 | 95,00 |
| R ₂ | 0 | 381 | 520 | - | 320 | - | |
| | 24 | 370 | 91 | 429 | 16 | 304 | 95,00 |
| R ₃ | 0 | 363 | 560 | - | 360 | - | |
| | 24 | 370 | 94 | 466 | 19 | 341 | 94,72 |
| R ₄ | 0 | 370 | 550 | - | 390 | - | |
| | 24 | 367 | 91 | 361 | 19 | 371 | 95,12 |
| R ₅ | 0 | 380 | 570 | - | 380 | - | |
| | 24 | 371 | 93 | 477 | 20 | 360 | 94,73 |
| R ₆ | 0 | 370 | 570 | - | 320 | - | |
| | 24 | 380 | 120 | 450 | 80 | 240 | 75,00 |
| R ₇ | 0 | 368 | 550 | - | 350 | - | |
| | 24 | 371 | 97 | 453 | 78 | 272 | 77,71 |
| R ₈ | 0 | 380 | 565 | - | 310 | - | |
| | 24 | 367 | 86 | 479 | 6 | 304 | 99,35 |
| R ₉ | 0 | 375 | 570 | - | 307 | - | |
| | 24 | 399 | 122 | 448 | 67 | 240 | 78,17 |
| R ₁₀ | 0 | 366 | 530 | - | 320 | - | |
| | 24 | 401 | 224 | 306 | 78 | 242 | 75,62 |
| R ₁₁ | 0 | 370 | 560 | - | 319 | - | |
| | 24 | 398 | 140 | 420 | 81 | 238 | 74,60 |
| R ₁₂ | 0 | 372 | 555 | - | 320 | - | |
| | 24 | 404 | 133 | 422 | 78 | 242 | 75,12 |

ANEXOS

XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos



15, 16 e 17 de julho de 1998
Rio de Janeiro

2 - Biotecnologia

| Nº | Título | 1º autor |
|-----|--|-------------------|
| 465 | ACTIVITY IN BRINE SHRIMP BIOASSAY OF NINETEEN BRAZILIAN PLANT EXTRACTS | Guimarães, L.A.S. |
| 441 | ADSORÇÃO DE LIPASE EM COPOLÍMERO DE ESTIRENO - DIVINILBENZENO | Oliveira, P.C. |
| 178 | ANÁLISE QUALITATIVA DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR <i>Rhizopus oligosporus</i> e <i>Hansenula anomala</i> ISOLADOS DO TARUBÁ | Carvalho, S.M.S. |
| 546 | ASPECTOS ANATÔMICOS DA FOLHA DE <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. (Erva-mate) E <i>Campomanesia xantocarpa</i> Berg. (Guavirova) | Valduga, E. |
| 278 | ATUAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS NA HIDRÓLISE DE ÓLEO DE SARDINHA | Carvalho, P.O. |
| 136 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE DE PRODUTOS DE AVEIA TRATADOS TERMICAMENTE | Gutkoski, L.C. |
| 137 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEROXIDASE DE PRODUTOS DE AVEIA TRATADOS TERMICAMENTE | Gutkoski, L.C. |
| 117 | AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E REDUÇÃO DE NITRITOS POR BACTÉRIAS LÁTICAS spp. ISOLADAS DE PRODUTOS CÁRNEOS | Balduino, R. |
| 25 | BITTERNESS REDUCTION IN GRAPEFRUIT JUICE THROUGH ACTIVE PACKAGING | Soares, N.F.F. |
| 122 | DESCOLORAÇÃO DE AZO-CORANTES POR ALGUNS FUNGOS LIGNINOLÍTICOS | Chagas, E.P. |
| 543 | DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO <i>Pleurotus ostreatus</i> EM MEIO LÍQUIDO VISANDO A PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS | Bruniera, L.B. |
| 389 | EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DO pH NA PURIFICAÇÃO PARCIAL DE LIPASE DE <i>Geotrichum</i> sp. POR CROMATOGRAPHIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA | Mendieta, O. |

XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos


"Alimento, População e Desenvolvimento"

Rio de Janeiro, 15, 16 e 17 de julho de 1998


CERTIFICADO

Certificamos que **Pedro Carlos de Oliveira**

participou do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos; realizado no período de 15 a 17 de julho de 1998, no Centro de Convenções do Hotel Glória no Rio de Janeiro - RJ.



Antonio de A. Figuelredo
Presidente do XVI CBCTA Alimentos



Franco M. Lajolo
Presidente da SBCTA



SBCTA - Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Regional do Rio de Janeiro / Matriz